

FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

N° 4197

THESE
de
DOCTORAT D'ETAT ES-SCIENCES

par

Fernand DRAY

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

**Contribution à l'analyse des stéroïdes cétoniques
et à l'étude métabolique de la testostérone
et de l'épitestostérone.**

Soutenue le **22 MAI 1970** devant la Commission d'Examen:

MM.	A. JOST	Président
	E. LEDERER	Examineur
	E.E. BAULIEU	Rapporteur
	M.F. JAYLE	Invités
	P. DESGREZ	

FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

N° 4197

THESE
de
DOCTORAT D'ETAT ES-SCIENCES

par

Fernand DRAY

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

**Contribution à l'analyse des stéroïdes cétoniques
et à l'étude métabolique de la testostérone
et de l'épitestostérone.**

Soutenue le

devant la Commission d'Examen:

MM.

A. JOST

Président

E. LEDERER

Examineur

E.E. BAULIEU

Rapporteur

M.F. JAYLE

P. DESGREZ

| Invités

FACULTY OF SCIENCES OF LEIDEN

NO. 1103

THESE

de

DOCTORAL DEGREE

by

HERMAN DEER

of Leiden

IN CANDIDACY FOR THE DEGREE OF DOCTOR

Contributions to the knowledge of the
biology of the *Hydra* and the
of the *Hydra*



Leiden, 1900

1900

Printed by

W. J. J. J.

1900

Leiden

1900

Leiden

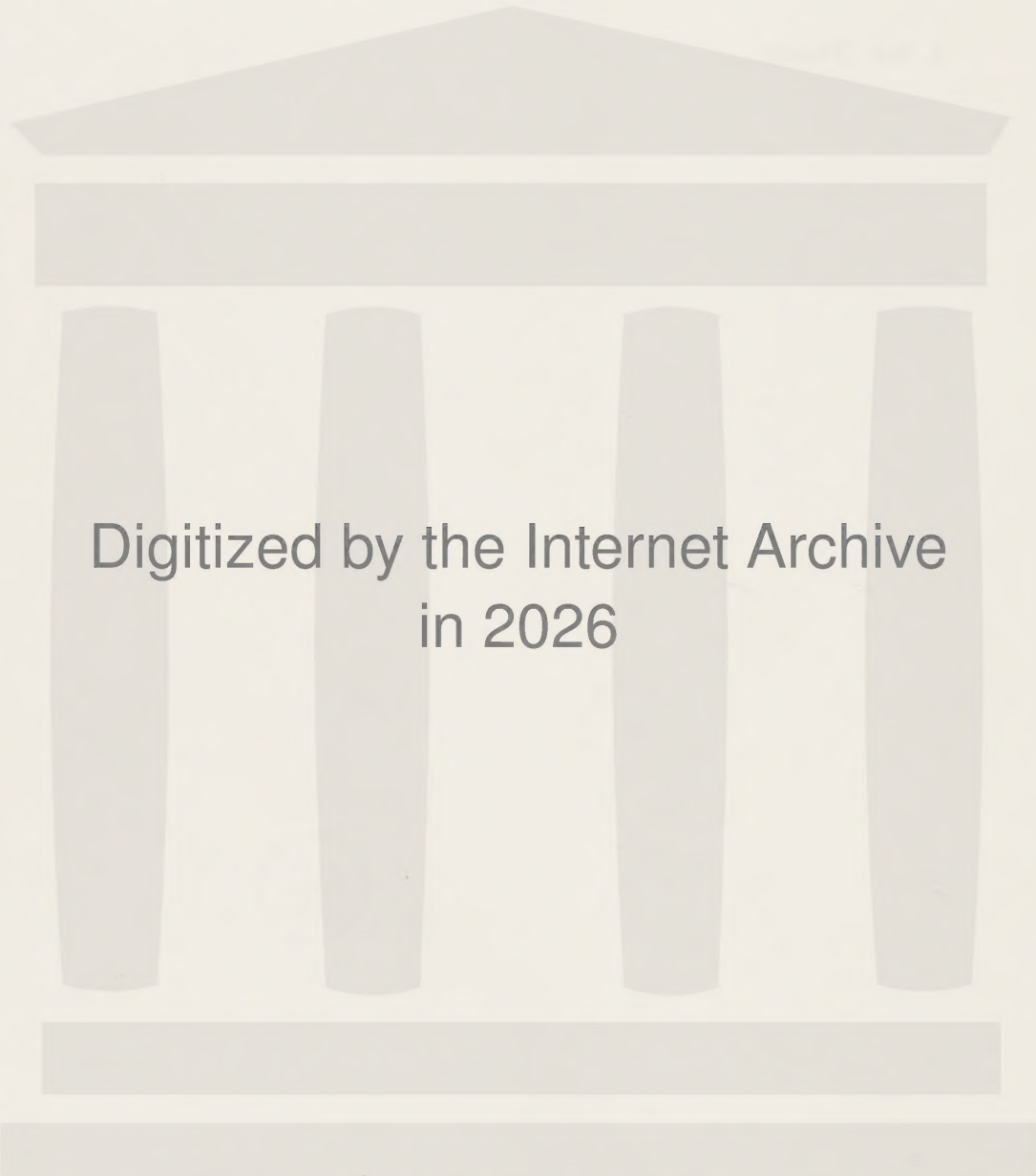
1900

1900

Leiden

1900

A ma Femme,



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550212_0045

A Messieurs les Membres du Jury :

Monsieur le Professeur A. JOST,

qui a bien voulu en accepter la
présidence.

Monsieur le Professeur E. LEDERER,

qui a accepté de juger ce travail,
en particulier dans sa partie analytique.

Monsieur le Professeur E.E. BAULIEU,

qui a accepté d'en être le rapporteur
et qui a contribué à ma formation de
chercheur.

Monsieur le Professeur M.F. JAYLE,

pour sa bienveillante attention dans
l'examen du manuscrit.

Monsieur le Professeur P. DESGREZ,

qui m'a permis de poursuivre mes
recherches dans son Service.

A Monsieur le Professeur GILBERT-DREYFUS,

qui m'a confié la direction de son
Laboratoire depuis 1954, m'a accordé
toutes les facilités pour réaliser
ce travail et m'a toujours témoigné
bienveillance et affection.

A Monsieur le Professeur J. SEBAOUN,

dont les conseils et l'amitié ont
été des facteurs constants d'encouragement.

A Monsieur le Docteur M. GUT,

dont la coopération dans le domaine
de la radioactivité et dans l'étude
des spectres IR et RNM a été précieuse.

A Monsieur le Docteur I. WELILY,

Je garde du séjour passé dans son
Laboratoire à Pittsburgh, un souvenir
ému.

A Mademoiselle O. CREPY,

sa compétence dans le domaine de la
liaison de la testostérone aux
protéines sériques, m'a beaucoup aidé.

A Monsieur le Docteur A. REINBERG,

qui m'a fait profiter de son expérience
des rythmes biologiques.

Nous remercions :

MM. S. BURSTEIN, C.C. SWELLY, F. HALBERG,
P. ROMBAUT, J.C. SAVOIE, F. GREMY, R. EMILIOZZI,
G. NOMINE, P. POIRIER, J.M. CHAUFFOURNIER,
MMes G. DELZANT et M.J. LEDRU, Melles I. MOWSZOWICZ,
A. SANTARAINIER et R.M. JEANNEAU qui nous ont
aidé au cours de ce travail, et MMe M.L. JUGE qui
a assumé la transcription dactylographique du
manuscrit.

CHAPITRE I

INTRODUCTION GENERALE

Il y a quelques années, le schéma classique du métabolisme des hormones stéroïdes était encore le suivant : l'hormone synthétisée et sécrétée atteint les organes cibles, puis est transformée en métabolites qui sont éliminés par l'urine après conjugaison avec l'acide sulfurique ou l'acide glucuronique, la conjugaison ayant essentiellement un rôle de "détoxication" (1, 2).

En réalité, il existe au moins deux ordres de faits qui obligent à reconsidérer ce schéma :

- la conjugaison des hormones stéroïdes ou de leurs métabolites n'est pas un simple phénomène de "détoxication",

- l'hormone sécrétée se trouve dans la circulation, liée d'une manière plus ou moins "spécifique" à des protéines, cette liaison jouant un rôle physiologique encore mal défini.

I - Conjugaison des stéroïdes

A - Sulfo-conjugaison.

En 1960, Baulieu (3) a montré pour la première fois l'existence d'une production par une tumeur surrénale, d'un sulfate de stéroïde : le sulfate de déhydroépiandrostérone. En 1963, Lieberman et al. (4) ont apporté la preuve d'une sécrétion de sulfate de déhydroépiandrostérone par les surrénales du sujet sain.

Le problème du métabolisme des sulfates de déhydroépiandrostérone, d'androstérone, de 5β -androstérone et d'épiandrostérone a fait l'objet d'études importantes par le groupe de Baulieu (5) et celui de Lieberman (4) ; en particulier la notion du métabolisme "direct" d'un stéroïde sulfoconjugué en un autre stéroïde sulfoconjugué, sans coupure préalable de la liaison sulfate, a été introduite et prouvée grâce à l'utilisation de sulfate- ^{35}S de stéroïde- ^3H (6, 7).

1 - Le sulfate de déhydroépiandrostérone, dont la sécrétion (20 à 30 mg/24 h) est de loin la plus importante de celle de tous les stéroïdes, a un rôle physiologique encore mal précisé, en dehors de celui démontré dans la grossesse. En effet, il est bien établi que le sulfate de déhydroépiandrostérone circulant maternel est un précurseur des oestrogènes dans la grossesse (8, 9, 10, 11). Le tableau I résume nos principaux résultats : le pourcentage de conversion en oestrone et oestradiol est plus fort à partir du sulfate

TABLEAU I

Conversion du sulfate de 7α - ^3H -déhédroépiandrostérone ($^3\text{H-SD}$), de 4 - ^{14}C -testostérone ($^{14}\text{C-T}$), de 4 - ^{14}C -androstènedione ($^{14}\text{C-}\Delta$) et de 4 - ^{14}C -déhédroépiandrostérone ($^{14}\text{C-D}$) en oestrogènes radioactifs urinaires chez 3 femmes, au 3ème trimestre d'une grossesse normale

Oestrogènes urinaires	G ₁ (7e mois) (1*)			G ₂ (9e mois) (2*)			G ₃ (8e mois) (1*)		
	Excrétion µg/jour	Conversion (%) à partir de	$^3\text{H-SD}$	Excrétion µg/jour	Conversion (%) à partir de	$^3\text{H-SD}$	Excrétion µg/jour	Conversion (%) à partir de	$^3\text{H-SD}$
			$^{14}\text{C-T}$			$^{14}\text{C-}\Delta$			$^{14}\text{C-D}$
Oestrone	505	7,50	1,05	700	4,11	1,11	230	1,10	0,34
Oestradiol	160	1,59	0,24	175	1,40	0,35	48	0,40	0,14
Oestriol	7 735	12,50	0,64	12 125	8,82	1,49	7 200	7,50	1,80

* Nombre de jours de recueil d'urine.

de déhydroépiandrostérone qu'à partir des stéroïdes libres, déhydroépiandrostérone, androstènedione ou testostérone. Trois hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces résultats :

- On peut supposer une capacité spéciale du sulfate de déhydroépiandrostérone à donner des oestrogènes lorsqu'il atteint le placenta, soit par une meilleure entrée dans les cellules ou fractions sub-cellulaires du placenta, soit par une meilleure utilisation par les systèmes enzymatiques contrôlant les processus d'aromatisation. Cependant des expériences d'incubation de tranches de placenta que nous avons faites selon le protocole de Ryan (12) mais sans addition de cofacteurs, ont montré que la formation d'oestrogènes est moins importante à partir du sulfate de déhydroépiandrostérone qu'à partir de déhydroépiandrostérone (tableau II). Les perfusions in situ (10) et in vitro (11) ont confirmé nos résultats d'incubation.

- La seconde hypothèse est celle de voies n'impliquant pas l'androstènedione ni la testostérone comme intermédiaire. Morato et al. (13), après des résultats d'incubation de microsomes de placenta ont ajouté à la séquence classique (sulfate de déhydroépiandrostérone → déhydroépiandrostérone → androstènedione → oestrone) deux autres voies :

- a) sulfate de déhydroépiandrostérone → sulfate de 19-hydroxy-déhydroépiandrostérone → 19-hydroxydéhydroépiandrostérone → 19-hydroxyandrostènedione → oestrone).

TABLEAU II

Incubations de tranches de placenta humain, réalisées 30 mn après la délivrance. L'incubation est faite à 37° pendant 1 h dans du tampon phosphate pH 7,4 et sans addition de cofacteurs. Pourcentage de transformation du sulfate de 7 α -³H-déhydroépiandrostérone et de la 4-¹⁴C-déhydroépiandrostérone et rapport ³H/¹⁴C obtenu dans les différentes fractions étudiées.

	³ H	¹⁴ C	³ H/ ¹⁴ C
Stéroïdes incubés.	(S- ³ H-DHA) 2,6 x 10 ⁶ cpm	(4- ¹⁴ C-DHA) 0,74 x 10 ⁶ cpm	3,2
<u>Stéroïdes isolés en %</u>			
Stéroïdes libres totaux	72	95	
Androstènedione	25	18,5	5
Testostérone	8,4	6,7	5
Oestrone	21	32	2,4
Oestradiol	2,5	3,8	2,4

b) sulfate de déhydroépiandrostérone $\longrightarrow$ déhydroépiandrostérone $\longrightarrow$ 19-hydroxydéhydroépiandrostérone $\longrightarrow$ 19-hydroxyandrostènedione $\longrightarrow$ oestrone ; l'importance relative de ces deux voies n'a pas été précisée.

•• Une troisième hypothèse est celle du métabolisme "protégé" du sulfate de déhydroépiandrostérone ; les stéroïdes libres, déhydroépiandrostérone, androstènedione et testostérone seraient "détoxiqués" rapidement et d'une manière importante par le foie en androstérone, 5 β -androstérone et androstaniols. D'un autre côté, le sulfate de déhydroépiandrostérone étant "protégé" plus longtemps contre l'inactivation hépatique, la molécule de déhydroépiandrostérone pourrait atteindre le placenta pour donner des oestrogènes. Cette explication est appuyée par les résultats de l'expérience du tableau III où l'on constate qu'avec le temps le sulfate de déhydroépiandrostérone devient un meilleur précurseur des oestrogènes que la déhydroépiandrostérone.

Le tableau I montre d'autre part, une conversion plus grande en oestriol à partir du sulfate de déhydroépiandrostérone, qu'à partir de l'un des trois androgènes libres : le sulfate d'androstènediol serait l'intermédiaire de cette voie, qui est un autre exemple du métabolisme "direct" de la forme sulfate (5).

Quelle est la signification physiologique du sulfate de déhydroépiandrostérone ? Les expériences citées

TABLEAU III

Métabolisme indirect hépatique et placentaire du sulfate de déhydroépiandrostérone.

Stéroïdes	Valeurs de R urinaire			Excrétion urinaire (%)	
	Urines du 1er jour		2ème jour	(2 jours)	
	0-3e h	3-6e h		³ H	¹⁴ C
Oestrone	0,56	1,00	1,34	2,0	1,8
Oestradiol	0,53	1,01	1,32	0,4	0,4
Oestriol	0,97	1,47	1,77	3,5	2,8
AG	0,13	0,48	1,36	1,1	2,5
5β-AG	0,17	0,74	1,12	0,8	1,1

R Urinaire : (³H/¹⁴C d'un métabolite x ¹⁴C/³H de l'injection) après injection de ¹⁴C-déhydroépiandrostérone et de sulfate de 7α-³H-déhydroépiandrostérone à une femme au 9ème mois d'une grossesse normale. Les valeurs > 1 indiquent une plus grande contribution du sulfate de 7α-³H-déhydroépiandrostérone et les valeurs < 1 une plus grande contribution de ¹⁴C-déhydroépiandrostérone aux stéroïdes, du côté maternel.

AG et 5β-AG : androstérone et 5β-androstérone glucuronide.



montrent bien que le sulfate de déhydroépiandrosterone est un substrat hormonal privilégié, mais a-t-il un effet hormonal typique ? Son activité androgénique, par les tests biologiques classiques, est très faible sinon négligeable. Des effets oestrogéniques du sulfate de déhydroépiandrosterone ont été montrés récemment chez le Rat (14) et des études portant sur le rôle du sulfate de déhydroépiandrosterone et de la testostérone sur le développement des os frontaux de l'embryon de poulet montrent pour la première fois une véritable action hormonale de ce sulfate, comparable à celle de la testostérone (15).

2 - Sulfate de cholestérol, isolé à partir de divers milieux biologiques de différentes espèces : chez l'Homme, dans le plasma au taux de 250 à 900 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ (16, 17), dans l'urine, dans des calculs biliaires, au niveau de la paroi aortique et dans des tumeurs surrénales avec syndrome de Cushing (18), dans le foie et le rein (19) ; chez le Boeuf, dans les surrénales (20).

Le site de formation du sulfate de cholestérol est encore obscure ; les essais de sulfatation du cholestérol ont échoué avec différents tissus : foie de lapin (21), préparations de foie et surrénales de boeuf, et surrénales humaines, par Roberts et al. (résultats non publiés). La seule démonstration de sulfatation du cholestérol a été montrée par Roy (22) à partir du foie de cobaye.

Bien que le sulfate de cholestérol est présent dans le plasma humain à une concentration plusieurs fois supérieure à celles des autres stéroïdes sulfates connus, son rôle biologique est encore mal connu. On a montré

par exemple que le système enzymatique mitochondrial de la surrénale de boeuf, impliqué dans la formation d'acide caproïque, convertit aussi bien le cholestérol que son sulfate (23) ; Roberts et al. (24) ont montré par ailleurs que le sulfate ^{35}S de cholestérol- ^3H qui a perfusé une tumeur surrénale in situ, était converti, sans perte du groupe sulfate, en différents stéroïdes sulfates urinaires, y compris le sulfate de déhydroépiandrostérone. Par contre, le sulfate de cholestérol né dans le sang ne semble pas être un intermédiaire important pour la biosynthèse du cortisol et du sulfate de déhydroépiandrostérone par les surrénales humaines normales (17).

3 - Sulfate de prégnénolone, sa présence dans le plasma du sujet adulte (25, 26) et du fœtus (27, 26) a été démontrée et sa concentration est plus élevée du côté fœtal que du côté maternel. Enfin les concentrations plasmatiques trouvées durant la grossesse (26) sont au moins aussi élevées que celles de la progestérone aux mêmes périodes de gestation (28).

De nombreuses études in vitro (29, 30, 31) et in vivo (32, 33, 34) entraînent la conviction d'une sécrétion surrénale de sulfate de prégnénolone et de sulfate de 17α -hydroxy-prégnénolone. De plus le testicule humain secrèterait du sulfate de prégnénolone (35).

Des homogénats de surrénale humaine normale peuvent transformer la prégnénolone en sulfate de prégnénolone, sulfate de 17α -hydroxy-prégnénolone, sulfate de déhydroépiandrostérone et sulfate de prégnénetriol : cependant dans les mêmes conditions d'incubation, le sulfate de

prégnénolone ne donne lieu à aucun produit de transformation (36). Lebeau et al. (37) ont obtenu, après incubation d'une tumeur surrénale, une faible conversion de ^{35}S -sulfate de $17\alpha\text{-OH}$ -prégnénolone tritiée en ^{35}S -sulfate de déhydroépiandrostérone tritiée.

Les résultats des études faites in vivo par Roberts et al. (24) et par Calvin et al. (38), après administration de ^{35}S -sulfate de cholestérol tritié, impliquent les transformations de sulfate de cholestérol et de sulfate de prégnénolone en sulfate de déhydroépiandrostérone à travers les intermédiaires sulfates. Enfin le sulfate de prégnénolone semble être un précurseur efficace de la progestérone dans le placenta à terme (39).

En résumé, l'importance quantitative de la voie directe qui conduit du sulfate de cholestérol au sulfate de déhydroépiandrostérone, reste à préciser : elle doit varier selon le tissu et selon qu'il s'agit d'un organe adulte ou foetal.

4 - Sulfate de testostérone, le sulfate de testostérone a été identifié par Saez et al. (40) dans le sang périphérique du sujet adulte sain : 108 ± 49 μg pour 100 ml chez l'homme, $18 \pm 7,5$ μg chez la femme. Il a également été identifié à partir de la veine spermatique des sujets sains (35), d'un malade présentant un carcinome du tissu intersticiel du testicule (41) et de 5 malades présentant un testicule féminisant (40). Son taux était élevé dans la veine surrénale et dans la veine ovarienne de femmes

ayant un syndrome de Stein Lowenthal ou une tumeur ovarienne (40). Lebeau et Baulieu (29) ont obtenu la sulfatation de la testostérone avec du tissu tumoral surrénalien.

L'existence de sulfate de testostérone dans l'urine de l'homme adulte normal n'est pas prouvée. Horton et al. (42), Camacho et al. (43) ont trouvé, après injection de testostérone tritiée 0,03 % de la radioactivité dans la région de la testostérone après solvolysé des urines. D'autre part, des valeurs non négligeables de testostérone, libérée par solvolysé de l'ordre de 6 à 10 µg pour certains (44), de 10 à 17 µg par 24 h pour d'autres (45) ont été signalées dans l'urine de l'homme normal. Mais dans aucun cas, des critères sérieux d'identification (spectre de masse, activité spécifique constante au cours de cristallisations successives) n'ont été apportés.

B - Glycuro-conjugaison.

On possède beaucoup moins d'informations concernant le rôle de la glycuro-conjugaison des stéroïdes. Cependant Robel (46, 47) a montré que les glucuronides d'androgènes sont métabolisés (notamment les glucuronides de testostérone qui sont des glucuronides d'hormone, et le glucuronide d'épiandrosterone, qui est un glucuronide de métabolite). Là encore, la conception selon laquelle la glycuro-conjugaison constitue un processus ultime de "détoxication" doit être reconsidérée. L'exemple du glucuronide de testostérone est significatif à cet égard (48). En effet - d'une part, plusieurs métabolites ont été isolés après administration par voie intra-veineuse de glucuronide de 4-¹⁴C-testostérone chez l'homme normal - d'autre

TABLEAU IV

Injection intraveineuse de glucuronide de 4-¹⁴C-testostérone (1 µC) à une femme normale, en fin de grossesse : pourcentage de la radioactivité éliminée dans les différents métabolites neutres et phénoliques, après hydrolyse enzymatique par le suc d'*Helix Pomatia*.

Stéroïde injecté	Glucuronide de 4- ¹⁴ C-testostérone (1 µC)
<u>Métabolites urinaires</u> (3 jours d'urines)	<u>Pourcentage de conversion</u>
Androstérone	<0,10
5β-androstérone	3,80
Testostérone	29,00
5β-androstènediol	8,25
Oestrone	<0,10
Oestradiol	<0,10
Oestriol	<0,10
Fraction non identifiée	2,27

part, ces métabolites étaient tous de la série 5 β -androstande et l'administration du ^{14}C -glucuronide de ^3H -testostérone a permis de démontrer l'existence d'un métabolisme "direct" sans rupture de la liaison osidique.

L'absence de coupure de la liaison osidique au cours du métabolisme du glucuronide de testostérone expliquerait le fait que nous n'ayions pu obtenir de conversion en oestrogènes après administration de glucuronide de 4 ^{14}C -testostérone (préparé par le Dr. Robel) à une femme gravide à terme, comme le montre le tableau IV. Ce métabolisme "direct" est envisagé également pour le glucuronide de déhydroépiandrostérone et d'épiandrostérone et fait postuler l'existence d'enzymes acceptant des glucuronides de stéroïde pour substrats (47).

II - La liaison stéroïdes~~es~~protéines sériques.

A - Sérum-albumine.

La liaison des stéroïdes circulants avec la sérum-albumine a été envisagée depuis longtemps :

- par comparaison de la solubilité des stéroïdes dans différents tampons et dans les mêmes tampons contenant de l'albumine à 5 % (49),

- étant donné le rôle déjà connu de cette protéine aussi bien pour différentes substances toxiques (50, 51), qu'endogènes.

- étant donné son importance quantitative par rapport aux autres protéines du plasma.

Cependant seuls les résultats des études faites ces dernières années présentent de l'intérêt par le développement des techniques (gel filtration, ultra-filtration..) et par l'utilisation d'isotopes d'activité spécifique élevée.

Le complexe ligand-protéine obéit in vitro, à la loi d'action de masse ; les principes et les concepts fondamentaux à la compréhension de ce phénomène ont été discutés par Klotz (52), Edsall et Wyman (53).. A l'équilibre, l'affinité de liaison est reliée à la constante d'association par la relation (54, 55) :

$$\frac{Su}{Sb} \times \frac{1}{P} = K(n - \frac{Sb}{P})$$

Sb est la concentration du stéroïde lié et Su celle du stéroïde non lié ; P, la concentration protéique ; K, la constante d'association et n, le nombre de sites de liaison par molécule de stéroïde.

Dans le cas de la sérum-albumine, la quantité de protéine présente est nettement supérieure à celle du stéroïde ; le rapport Sb/P est négligeable et Su/Sb est indépendant de la valeur de la concentration du stéroïde non lié. La constante d'association stéroïdes libres/sérum-albumine humaine varie, à 4°C de $0,1 \times 10^4$ pour le cortisol à 1×10^5 litres par môle pour l'oestradiol, la liaison étant d'autant plus forte que le stéroïde est moins polaire (56).

Les sulfates de stéroïde sont plus fortement liés à la sérum-albumine : Plager (57) l'a montré pour les sulfates de déhydroépiandrosterone, d'étiocholanolone et d'androsterone chez l'Homme, Wang et al. (58) l'ont établi pour les sulfates de déhydroépiandrosterone, de testostérone et de prégnénolone chez l'Homme, le Lapin et le Rat : ces trois derniers sulfates occuperaient les mêmes sites de liaison et le sulfate de déhydroépiandrosterone serait déplacé par des sulfates de composés organiques non stéroïde ; les sites de liaison ne seraient donc pas spécifiques pour les sulfates de stéroïde.

On avait mis l'accent au début des recherches sur le rôle de transport de la liaison des stéroïdes avec la sérum-albumine : en fait, ce rôle est sûrement exagéré, si l'on tient compte des solubilités et des concentrations des stéroïdes dans le sang.

B - Protéines "spécifiques".

Des études de dialyse à l'équilibre de plasma humain dilué ont permis de montrer que la sérum-albumine ne rend pas compte à elle seule de la liaison de certaines hormones stéroïdes.

1 - Corticostéroïdes

L'existence d'une protéine "spécifique" de faible concentration mais de forte affinité a été montrée pour le cortisol et la corticostérone presque à la même époque par différents auteurs (59, 60, 61, 62).

Cette protéine "spécifique", nommée transcortine ou cortico-steroid-binding-globulin (CBG) a été, par la suite, isolée et caractérisée (63 à 68). La transcortine humaine est une α_1 -globuline, glycoprotéine dont le poids moléculaire est 31 700. Elle ne possède qu'un site de liaison pour le cortisol et la constante d'association pour le cortisol est de 3×10^7 L/M à 37°C. L'introduction de fonctions hydroxyles en position 11 β , 17 α et 21 augmente l'affinité de liaison pour la transcortine (69).

La liaison des corticostéroïdes à la CBG est augmentée chez certaines espèces, au cours de la gestation, sous l'effet des hormones oestrogéniques (70 à 74) et thyroïdiennes (75), probablement par suite d'une synthèse accrue de la protéine de liaison (76) ; le cortisol lié à la transcortine verrait son activité biologique diminuée ou abolie in vivo (77, 78) et in vitro (79, 80, 81) et son métabolisme hépatique ralenti (81). En fait, Keller et al. (82), dans une étude d'induction in vivo des alanine - amino - transférases hépatique et pancréatique par les corticostéroïdes chez les Rats normaux et traités par les oestrogènes, ont montré que cet effet d'induction est une fonction indirecte du taux des protéines plasmatiques liant les corticostéroïdes. Ces protéines auraient pour rôle d'augmenter la sélectivité du système surrénal en fractionnant son influence sur les organes cibles en fonction des conditions anatomiques de la microcirculation : l'augmentation simultanée des corticostéroïdes et de la CBG aurait pour effet de distribuer la stimulation surrénale vers les organes perméables à la protéine et non vers les récepteurs dont les parois des capillaires y seraient imperméables.

Les concentrations relatives des différents stéroïdes liés à la même protéine doivent être considérées. Une étude récente de Rosenthal et al. (83) est intéressante à ce propos. Ces auteurs confirment d'une part l'augmentation au cours de la grossesse du cortisol non lié, trouvée précédemment (84, 85) et montrent d'autre part que le pourcentage de cortisol distribué entre la CBG, l'albumine et la fraction non liée reste presque constante durant la grossesse et très semblable à celui des femmes normales. L'augmentation du cortisol non lié peut expliquer notamment l'hyperleucocytose et l'éosinopénie, la glycosurie (86), l'aminosacidurie (87) constatées au cours de la grossesse ou durant l'administration d'oestrogènes. Au cours de la grossesse, ces auteurs constatent également une augmentation de la progestérone non liée et un pourcentage non modifié de distribution de la progestérone entre la transcortine, l'albumine, l'orosomucoïde de Westphal et la fraction non liée. Puisque la constante d'association de la progestérone pour la CBG est plus grande que celle du cortisol, on peut penser que la progestérone en se liant, va déplacer le cortisol de sa liaison avec la transcortine et que la progestérone liée est inactive biologiquement et échappe au métabolisme (83, 88).

2 - Testostérone et 17 β -oestradiol.

Les progrès dans la connaissance de la liaison "spécifique" des principales hormones sexuelles, testostérone et oestradiol, sont plus récents. Certes l'existence d'une protéine autre que l'albumine liant la testostérone a été présumée par Slaunwhite et al. en 1959 (89), puis par Chen en 1961 (90). En fait, la première tentative d'identification est due à Mercier et al. en 1965 (91) qui ont

montré qu'il s'agit d'une β -globuline dont certains critères physico-chimiques ont été récemment apportés (92 à 97). Pearlman et Crépy (98), Pearlman et al. (99) ont été les premiers à entreprendre une étude quantitative de cette liaison, par une approche originale de dialyse à l'équilibre utilisant du Séphadex G 25 ; ils ont montré que leur index d'affinité, évalué à 50 % de liaison, est plus élevé chez la femme que chez l'homme, qu'il augmente chez la femme au cours de la grossesse et dans les deux sexes lors de l'administration d'oestrogènes. Ces variations ont été retrouvées en utilisant d'autres techniques de dialyse à l'équilibre (100, 101, 102) ou d'électrophorèse sur papier (103). Des études de compétition faites avec du sérum ou une fraction purifiée de celui-ci ont montré que la spécificité de cette liaison n'était pas absolue et que, notamment l'oestradiol pouvait déplacer la testostérone (94, 100, 102, 101, 104).

La constante d'association d'une fraction purifiée et active de sérum est plus forte pour la testostérone que pour l'oestradiol-17 β et il semblerait n'exister qu'un site d'action pour les deux hormones (105). La β -globuline liant la testostérone et décrite par Mercier et al. (91) serait donc celle qui a été étudiée par Rosenbaum et al. (106) et qui lie l'oestradiol 17 β .

OBJET DES RECHERCHES

Entre 1962 et 1964 nous avons travaillé dans le Laboratoire du Pr. E.E. Baulieu où nous avons eu le privilège de participer à l'étude de problèmes posés par la conjugaison des androgènes : notamment son rôle dans les processus d'aromatisation chez la femme en fin de grossesse ou in vitro à partir de placenta humain. Les résultats que nous avons obtenus (tableaux I à IV) et leurs significations ont été envisagés au chapitre I et fait l'objet de différentes publications (5, 8, 303).

I - Les principes méthodologiques, les modalités de réflexion que nous avons acquis durant cette période ont été décisifs pour les recherches que nous avons entreprises depuis lors sur le métabolisme in vivo des 17 β -OH-androstène-3-ones. L'isomère 17 β -OH, ou testostérone est la principale hormone mâle sécrétée par les testicules chez l'homme : son métabolisme est maintenant bien connu. L'isomère 17 α -OH, ou épitestostérone, a été identifié pour la première fois dans l'urine humaine en 1953 (144). Les problèmes de son origine, de son état dynamique (production, concentration, clearance métabolique, liaisons éventuelles dans le sérum), de sa dégradation, et de son rôle se posaient entièrement. Ce travail avait pour but de contribuer à y répondre.

Chemin faisant, nous avons montré l'existence de l'ester-sulfate de l'épitestostérone dans l'urine et dans le plasma de l'homme normal et d'une production de sulfate d'épitestostérone nettement supérieure à celle de l'épitestostérone. Ceci nous a conduit à une étude comparative du métabolisme de la testostérone et de l'épitestostérone (libres et ester-sulfates) :

- métabolites urinaires après administration de traceurs radioactifs,
- concentrations dans le plasma et dans l'urine,
- clearance métabolique,
- taux de production,
- variations circadiennes des taux plasmatiques et urinaires,
- modalités de liaison aux protéines sériques.

II - Pour estimer d'une manière précise et spécifique les faibles concentrations de ces stéroïdes dans les urines et surtout dans le sang (les valeurs extrêmes des concentrations plasmatiques étant de 0,010 µg à 1 µg pour 100 ml), nous avons été conduits à une importante mise au point technique. La testostérone et l'épitestostérone possédant une fonction alcool facilement acétylable et une fonction cétone, nous avons développé une méthode par double dilution isotopique, utilisant comme indicateur interne, l'anhydride acétique radioactif, marqué avec du tritium ou du ^{14}C suivant le problème à résoudre.

Pour augmenter la spécificité de la technique, nous avons formé le dérivé méthoxime de l'acétate de stéroïde. L'utilisation de ce dérivé nous a conduit à une étude analytique importante des méthoximes de 24 stéroïdes cétoniques.

Ce dernier travail commencé en 1966 dans les Laboratoires des Drs Weliky et Sweely (University of Pittsburgh, Pennsylvania), a été poursuivi à Paris dans le Service du Pr. Desgrez (C.H.U. de la Pitié).

CHAPITRE II

ETUDE ANALYTIQUE DES METHOXIMES DE DIVERS STEROIDES CETONIQUES

INTRODUCTION

En 1965, Fales et al. (107) ont montré que le chlorhydrate de O-méthyl-hydroxylamine, $\text{CH}_3\text{-O-NH}_2\text{,HCl}$ réagit facilement avec des composés cétoniques pour donner des dérivés méthoximes (MO) : ces dérivés sont stables dans les conditions habituelles de manipulation au laboratoire et notamment en chromatographie gazeuse, ce qui les rend utiles dans des études analytiques et structurales. Dans cette perspective, nous avons entrepris en 1966, une étude portant sur le comportement chromatographique dans différents supports et avec différents systèmes des méthoximes de divers stéroïdes : la constatation de deux dérivés méthoximes (isomères syn et anti) de la fonction cétone portée par le carbone 3 nous a conduit d'une part à rechercher le nombre maximum de méthoximes susceptibles d'être formés à partir d'un stéroïde, compte tenu de la place et du nombre des fonctions cétones, d'autre part à étudier leur cinétique de formation (108, 306).

24 stéroïdes ayant une fonction cétone en 3, 11, 16, 17 ou 20 ont fait l'objet de ce travail. Pour chacun d'eux, le nombre maximum de méthoximes formés a été recherché. Dans ce but, nous avons testé leur nombre d'après leur comportement dans différents systèmes chromatographiques (chromatographie en couche mince sur silicagel et sur alumine, chromatographie en phase gazeuse sur des phases non sélectives et sélectives). Dans certains cas, malgré ces différentes tentatives de séparation, le nombre de dérivés méthoximes n'a pas varié ; le cas de la cétone en 17 est un bon exemple : dans tous les systèmes chromatographiques utilisés, nous n'avons obtenu qu'un seul dérivé méthoxime : ceci plaide en faveur de l'absence d'isomère en 17, mais il est bien évident que nous ne pouvons en avoir la certitude. Cependant étant donné la diversité des systèmes employés dans la plupart des cas et les conditions cinétiques d'étude, il est vraisemblable que le nombre de méthoximes trouvés correspond à ceux réellement formés. Pour tous les stéroïdes cétoniques naturels, nous avons entrepris une étude cinétique de formation des méthoximes : la somme des informations recueillies nous a permis d'apporter des indications sur la réactivité d'une cétone en fonction de sa position dans la molécule.

Enfin dans le cas de la progestérone, de l'androstènedione et de la testostérone nous avons pu entreprendre une étude importante et notamment identifier leurs différents méthoximes par spectrométrie de masse. La méthodologie utilisée spécialement dans l'étude des méthoximes trouvera son développement dans ce chapitre.

PROCEDE EXPERIMENTAL

Matériel.

- Les solvants, de qualité analytique, ont été redistillés avant l'emploi.
- Les stéroïdes non radioactifs étaient des échantillons commerciaux : la plupart d'entre eux ont été obtenus grâce à l'obligeance du Dr. G. Nominé (Roussel Uclaf, Romainville France) ; après recristallisations, leur point de fusion était conforme à la valeur de la littérature.
- Les stéroïdes radioactifs, 7α - ^3H progestérone et $1,2$ - ^3H -testostérone ont été obtenus de N.E. Nuclear Corp. Boston Massachusetts, et chromatographiés sur colonne de célite et en couche mince sur silicagel ou alumine.
- Nous avons utilisé deux qualités de réactif :
 - 1 - O-méthyl-hydroxylamine, HCl de Eastman Organic Chemical, Rochester, N.Y.
 - 2 - O. méthyl-hydroxylamine, HCl- ^{14}C (0,12 $\mu\text{C}/\text{mM}$) de N.E. Nuclear Corp.

Préparation des méthoximes

Les méthoximes ont toujours été formés dans la pyridine, à la température du laboratoire : à une quantité déterminée du stéroïde cétonique nous avons ajouté la même quantité de chlorhydrate de O.méthyl-hydroxylamine en solution dans la pyridine (10 mg/ml). Dans certains cas, le pourcentage de transformation a été évalué d'une manière précise par l'addition au mélange réactionnel du même stéroïde radioactif. Dans les études cinétiques, la réaction a été suivie en chromatographie en phase gazeuse en injectant à des intervalles de temps connus, 1 à 2 μ l de la solution.

Pour des études préparatives, le mélange réactionnel ($\sim$ 20 mg de stéroïde et 20 mg du réactif dans 2 ml de pyridine) a été laissé 15 h à la température du laboratoire ; après addition de 25 ml d'acétone, l'extrait a été évaporé sous vide à 40°C, et l'excès de pyridine chassé après addition de 2 x 5 ml de benzène. L'extrait sec a été purifié dans différents systèmes chromatographiques et recristallisé dans l'éthanol aqueux ou le méthanol.

Analyses chromatographiques.

- Chromatographie en phase gazeuse.

Nous avons utilisé le chromatographe F & M modèle 400, et des colonnes de verre de 6 ou 8 pieds x 3 mm préparées avec les phases SE 30-3 % ou XE 60 - 2 % (Gas chrom Q 80/100 mesh Applied Science Co-State College - Pa). L'analyse des effluents a été faite avec un détecteur à ionisation de flamme. La température de la colonne SE 30 était

de 230-234°C, celle de XE 60 variait selon les cas de 190 à 230°C. Injecteur 245°C - Détecteur 235°C, 40 ml azote/mm.

- Chromatographie en couche mince.

Nous avons utilisé le silicagel G F 254 et l'alumine G F 254 activé 1 h à 110°C avant l'emploi. Les composés ayant le groupement Δ^4 -3 cétone, ou Δ^4 -3 (MO) ont été repérés avec une lampe UV (Mineralight, model R-51, Ultraviolet Products, Los Angeles). Les autres composés ont été localisés par la coloration développée après vaporisation d'une zone réduite de la plaque avec une solution à parties égales de SO_4H_2 et d'EtOH et chauffage à 120°C pendant 5 mn.

Dans les cas de purification à l'échelle préparative, la séparation des différents dérivés a été obtenue par l'emploi de grandes plaques (45 x 20 cm). Les extraits ont été élués avec de l'acétone ou de l'acétate d'éthyle. Les systèmes de solvants utilisés seront indiqués plus loin : dans tous les cas, le réactif n'ayant pas réagi, ou le méthoxime formé avec l'acétone, migrait avec le front du solvant..

Spectrophotométrie dans l'ultraviolet (UV).

Nous avons établi le spectre dans l'UV des stéroïdes ayant le groupement Δ^4 -3 cétone ou Δ^4 -3 (MO), après dilution dans 3 ml de méthanol, à l'aide du spectromètre 505 (Baush et Lomb). Nous avons déterminé les valeurs précises des λ_{max} à l'aide d'un spectromètre Zeiss PMQ II (Carl Zeiss, Germany).

Spectrométrie de masse.

Nous avons réalisé les différents spectres de masse dans le Laboratoire du Dr.C.C. Sweely, Univ. of Pittsburgh ; pour chaque spectre, la hauteur des pics a été mesurée et exprimée en pourcentage du pic le plus élevé.

Mesure de la radioactivité.

Les radioactivités tritiée et ^{14}C ont été appréciées simultanément dans un spectromètre à scintillation liquide de type Packard, modèle 3 003, dans les conditions de réglage décrites plus loin. La correction du quenching a été faite par la méthode du standard interne.

RESULTATS

1 - Méthoximes de progestérone.

Etude chromatographiques.

La chromatographie en couche mince sur alumine dans le benzène a montré la formation possible de 5 dérivés MO. Les dérivés a et b du tableau V correspondent aux isomères du 3,20-di-MO, les dérivés c et d aux isomères du 3-MO et le dérivé e correspond au 20-MO.

La chromatographie en phase gazeuse sur SE 30 à 234°C ou sur XE 60 à 230°C n'a montré que 3 pics supplémentaires à celui de la progestérone (Fig. 1) : le pic II correspond aux isomères du 3,20 di-MO. L'utilisation d'une phase XE 60 - 2 % avec une colonne de 8 pieds et une température à 190°C fait apparaître 2 dérivés dans chacun des pics II et IV (tableau V).

TABLEAU V

Méthoximes de progestérone
Critères chromatographiques, spectre UV ($\lambda_{\max}$) et spectre de masse

Structure	CCM ⁺	Spot	Rf	Pic	SE 30	XE 60	CPG ⁺⁺	λ max m μ	Principaux pics de masse (m/e)											
									M	-CH ₃	-OCH ₃	Fragmentation								
												A	B	C	D	E	F	G	H	
Pro-3,20-MO	a	0,71			1,36	0,398		251	372	357	341		286	273	153	151	137	125	100	8
	b	0,65		IV	1,36	0,401		254												
Pro-3-MO	c	0,55			1,07	0,533		251	343	328	312		300		153	151	137	125		
	d	0,42		II	1,07	0,540		254												
Pro-20-MO	e	0,26		III	1,25	0,717		242	343	328	312		257	244						100
Progestérone	f	0,00		I	1,00	1,000		242	314	299		273	244	124						

⁺ CCM : Chromatographie en couche mince sur alumine dans le benzène

⁺⁺ CPG : Chromatographie en phase gazeuse - SE 30 - 3%, 6 pieds, temp. 234°

XE 60 - 2%, 8 pieds, temp. 190°

⁺⁺⁺ TRR : Temps de rétention relatif.

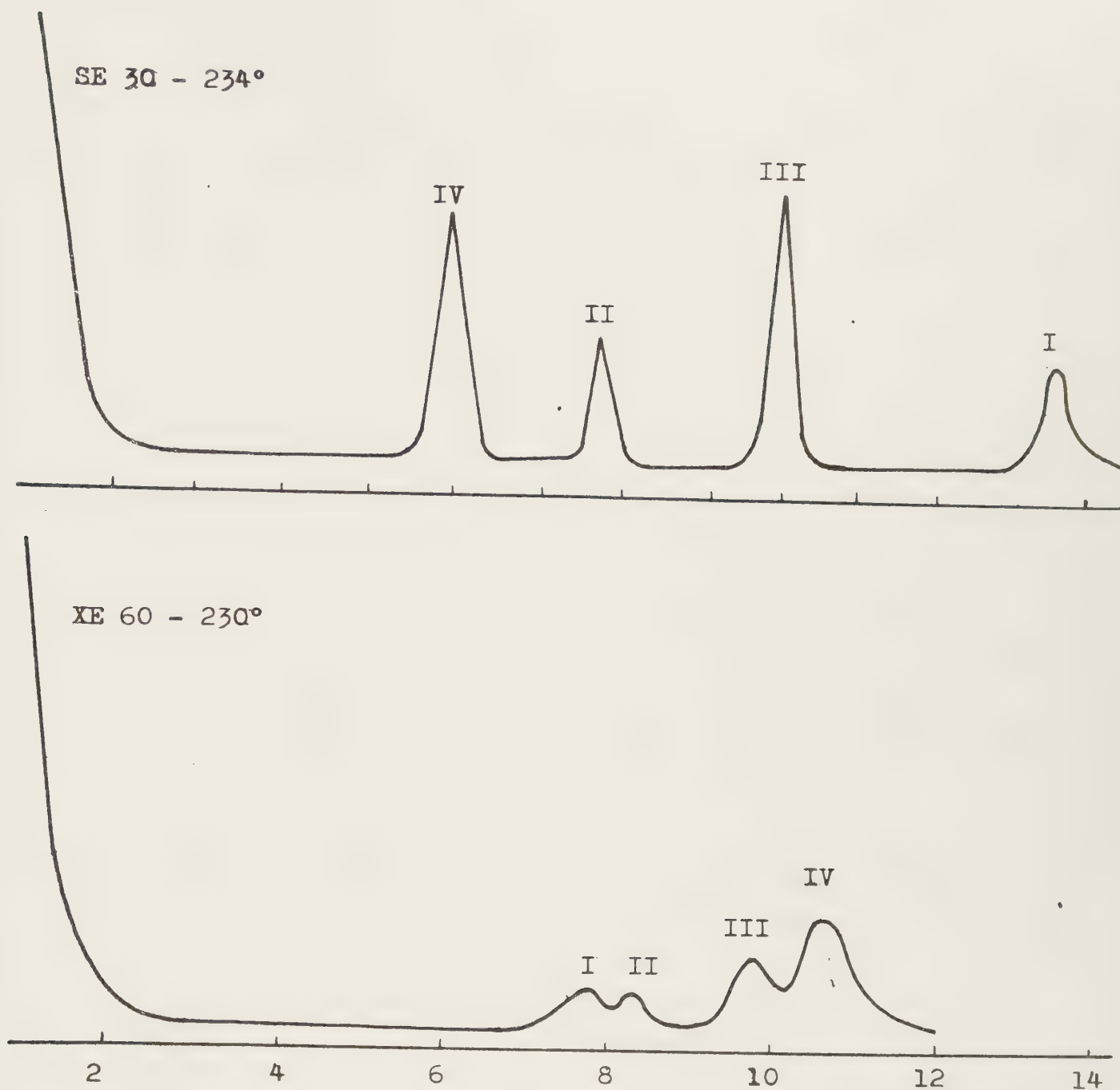


Fig. 1

Chromatographies en phase gazeuse sur SE 30 et sur XE 60 de la progestérone (pic I) et de ses dérivés méthoximes :

- 3-MO (pic II)
- 20-MO (pic III)
- 3,20-diMO (pic IV)

L'étude cinétique faite sur SE 30 (Fig. 2) montre que l'augmentation brusque et importante du pic IV (di-MO) correspond à la chute des pics II (3-MO) et III (20-MO) : après 60 mn de réaction, la totalité de la progestérone a été transformée et on ne retrouve que le pic IV.

Spectres de masse (Fig. 3 à 7 et tableau I).

- 3-20 di-MO : Le spectre de masse (Fig. 3) pour les isomères a et b est le même. L'ion moléculaire M^+ 372 correspond au poids moléculaire (PM) du di-MO dérivé. Les pics m/e 357 et m/e 341 correspondent respectivement à la perte d'un méthyl et d'un méthoxyl. Le pic m/e 286 (M-86) peut provenir du clivage selon B et le pic m/e 273 (M-99) du clivage selon C (Fig. 6). Les pics m/e 87 et m/e 100 peuvent être représentés respectivement par les structures I et H, dérivant des mêmes mécanismes que ceux proposés dans le cas des éthylènes cétales (réf. 109 et Fig. 7).

- 3-MO : Le spectre de masse (Fig. 4) pour les isomères c et d est le même. L'ion moléculaire M^+ 343 correspond au PM d'un monométhoxime de progestérone. Les pics m/e 328 et m/e 312 correspondent respectivement à la perte d'un méthyl et d'un méthoxyl. Le pic m/e 300 (M-43) correspond au pic m/e 271 trouvé pour la progestérone et peut être représenté par la structure A (2) de la figure 6. Les pics m/e 153, m/e 151, m/e 137 et m/e 125 sont retrouvés dans le 3-MO et le 3,20 di-MO ; la figure 6 montre le type de fragmentation possible dans ces différents cas.

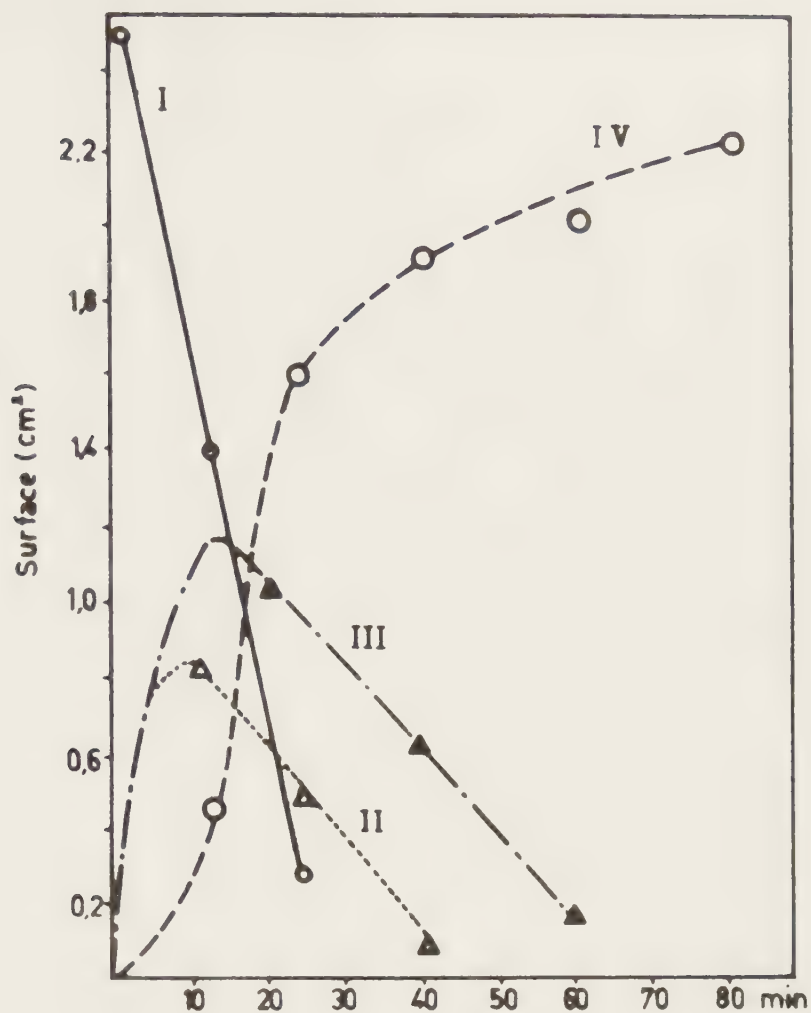


Fig. 2

Etude cinétique de formation des méthoximes de
progesterone suivie par chromatographie gazeuse
sur SE 30, température 230° :

- I - progesterone
- II - dérivé 3-MO
- III - dérivé 20-MO
- IV - dérivé 3,20-diMO

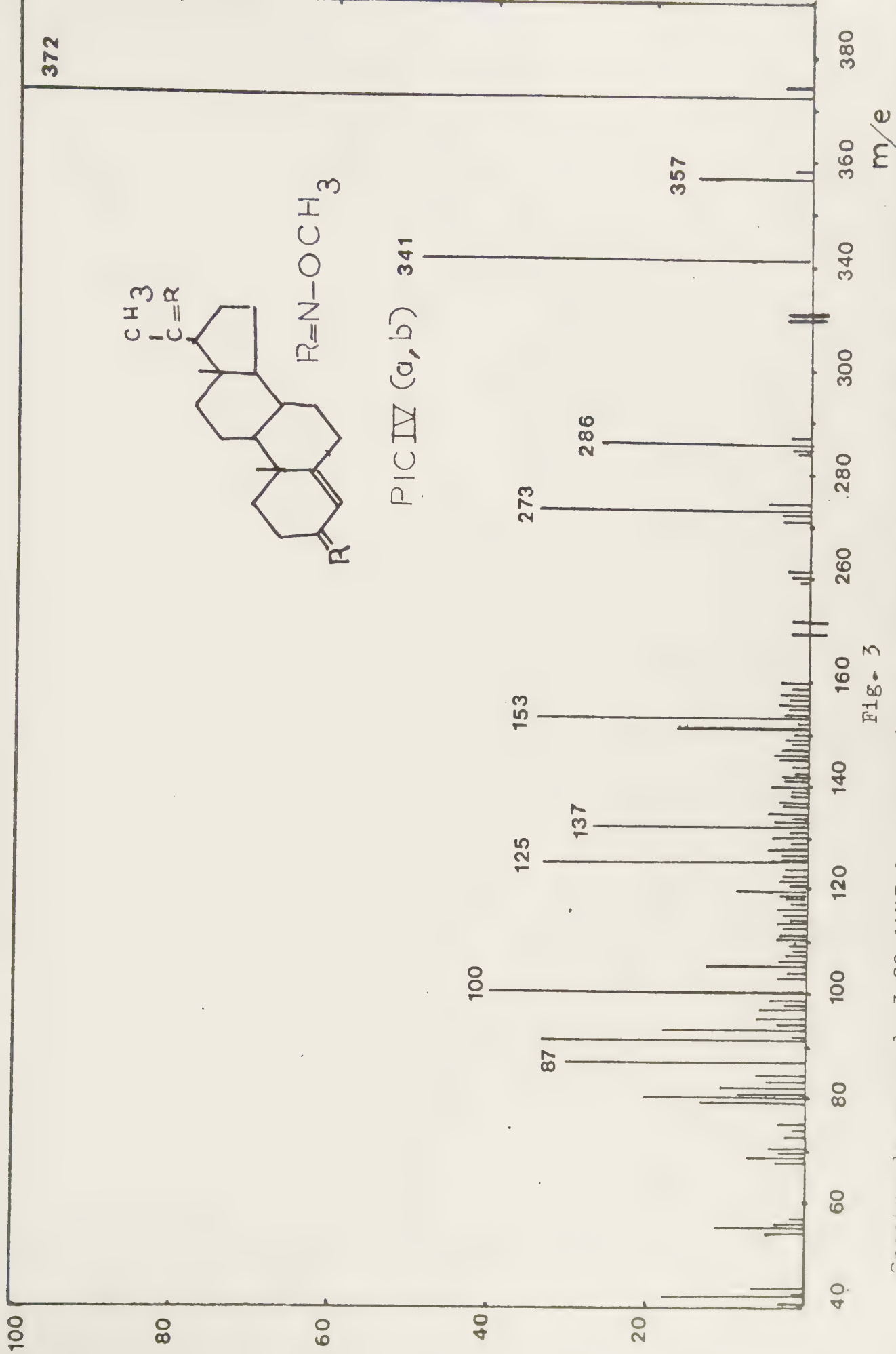


Fig. 3

Spectre de masse du 3,20-diMO de progestérone, obtenu à partir du pic IV, après chromatographie gazeuse sur SE 30, ou des spots a et b après chromatographie en couche mince.

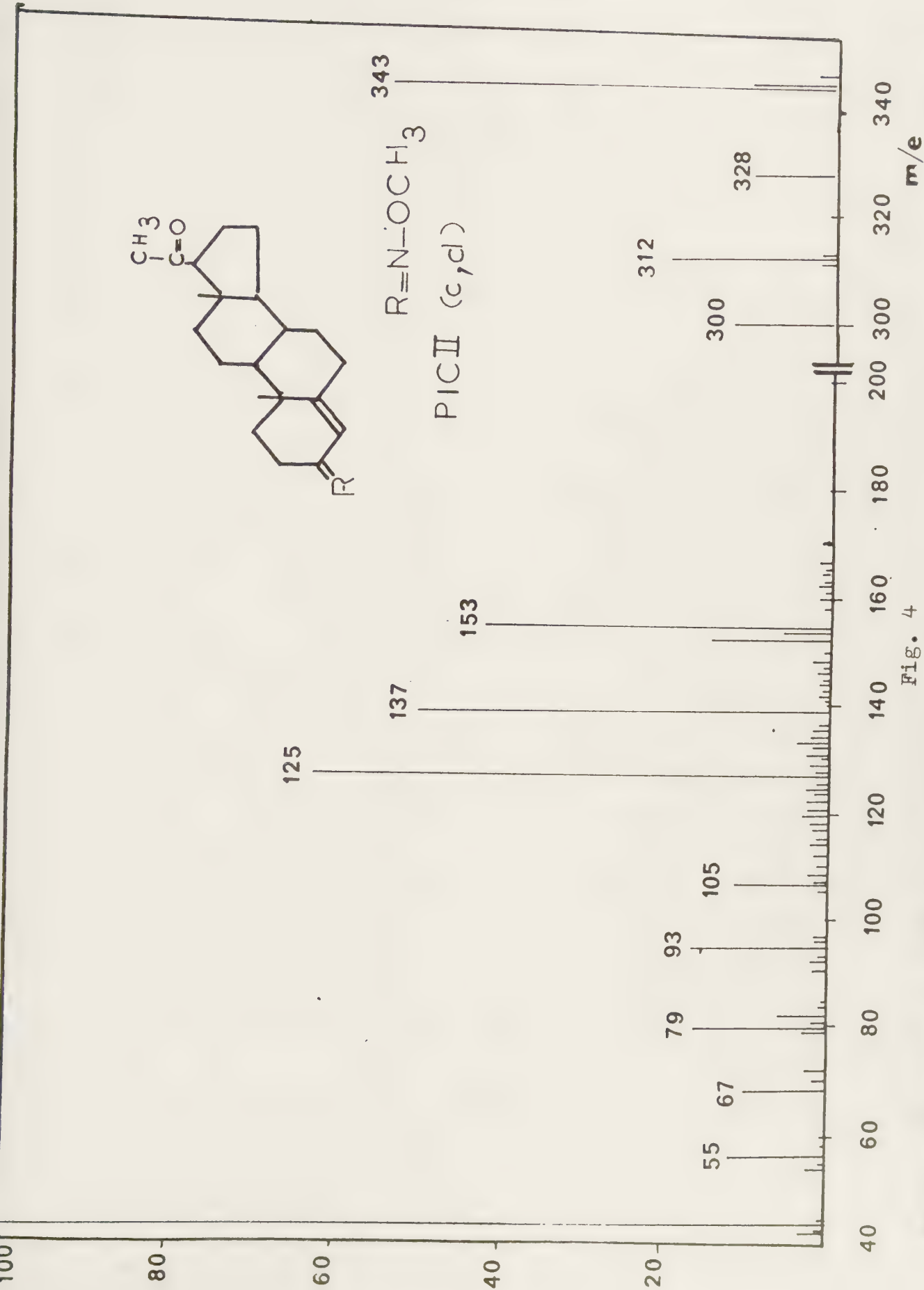


Fig. 4

Spectre de masse du 3-MO de progestérone, obtenu à partir du pic II après chromatographie gazeuse sur SE 30, ou des spots c et d après chromatographie en couche mince.

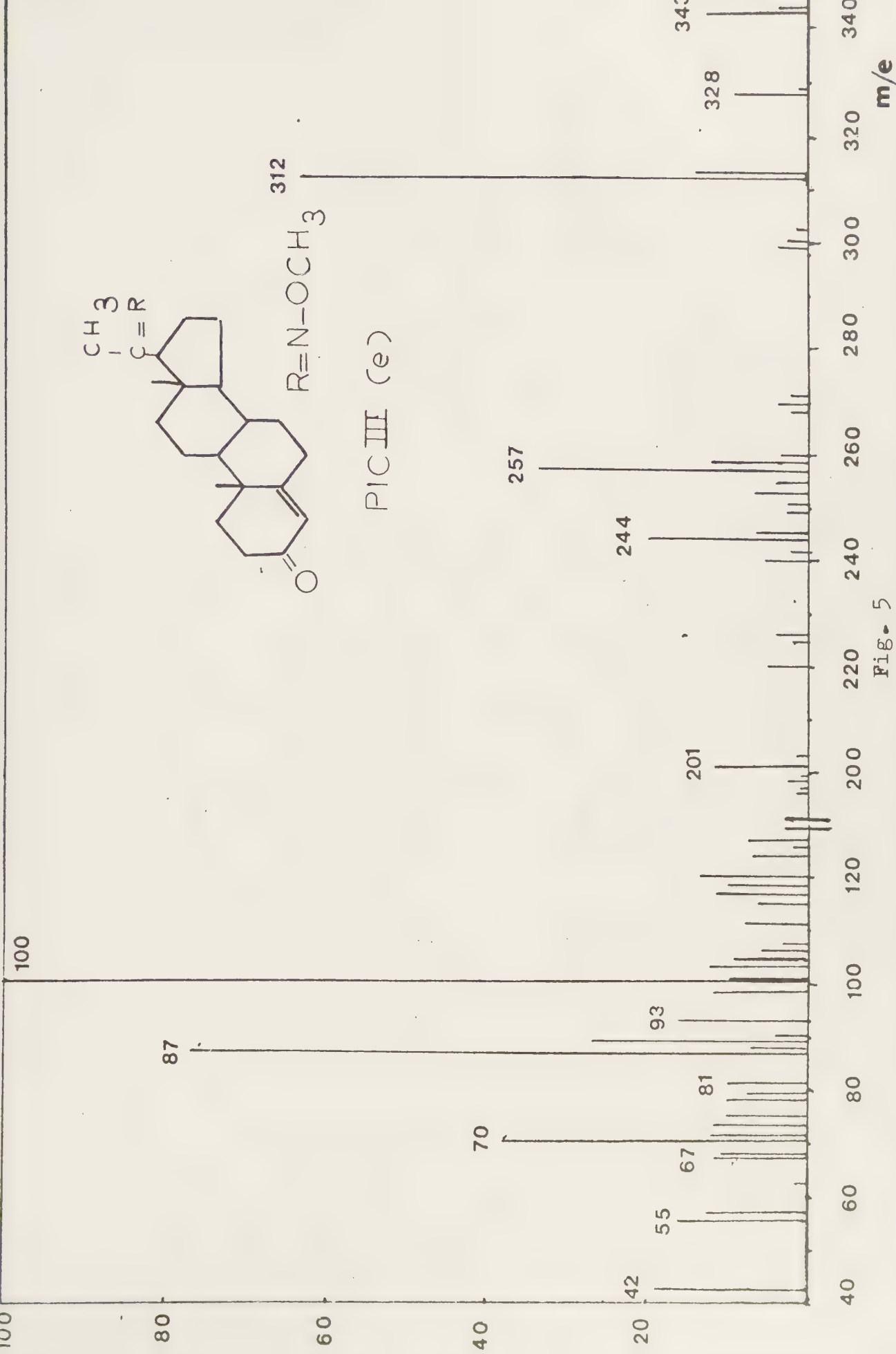


Fig. 5

Spectre de masse du 20-MO de progestérone, obtenu à partir du pic III après chromatographie gazeuse sur SE 30, ou du spot e après chromatographie en couche mince.

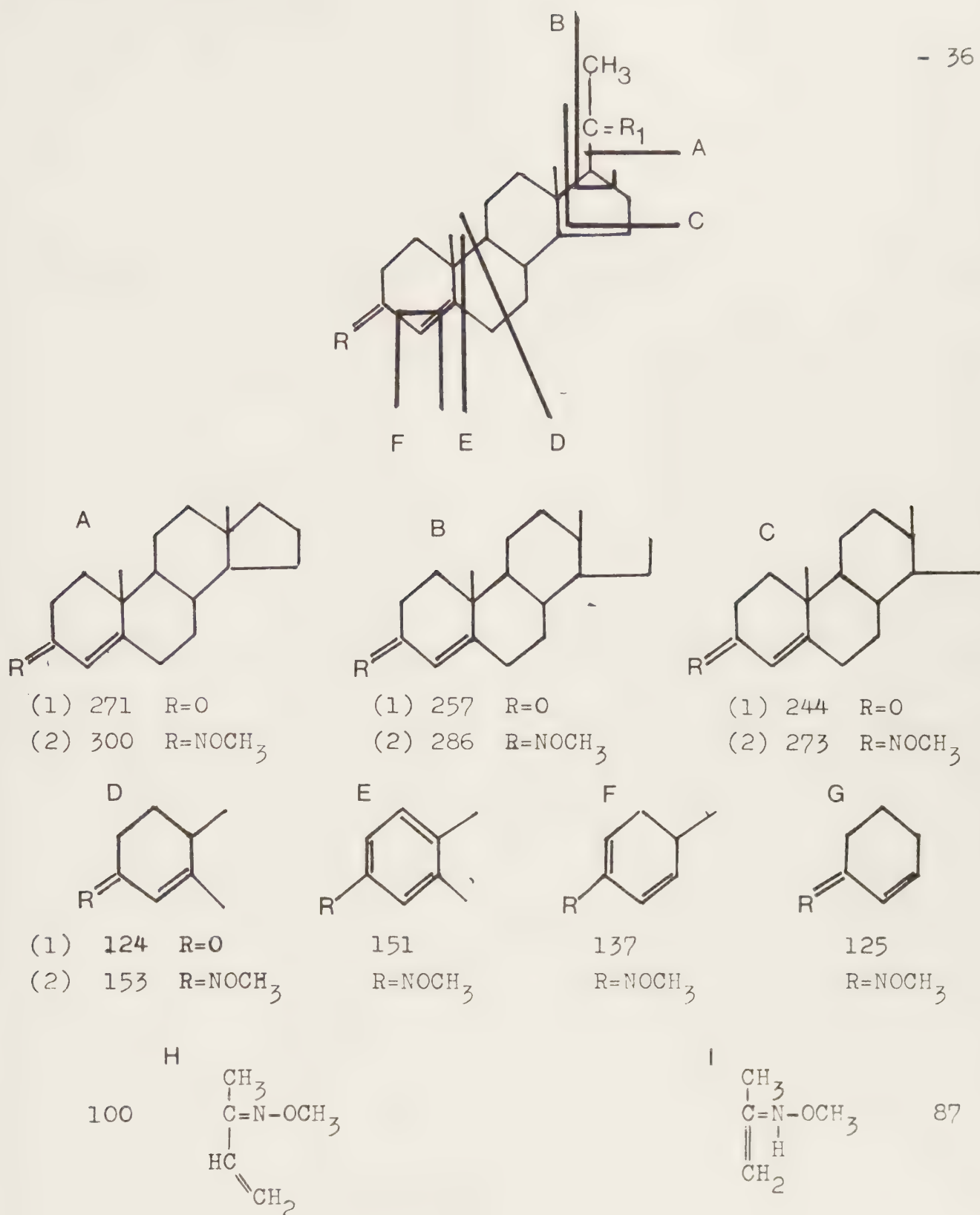


Fig. 6

Types de fragmentation par spectrométrie de masse
des méthoximes de progestérone

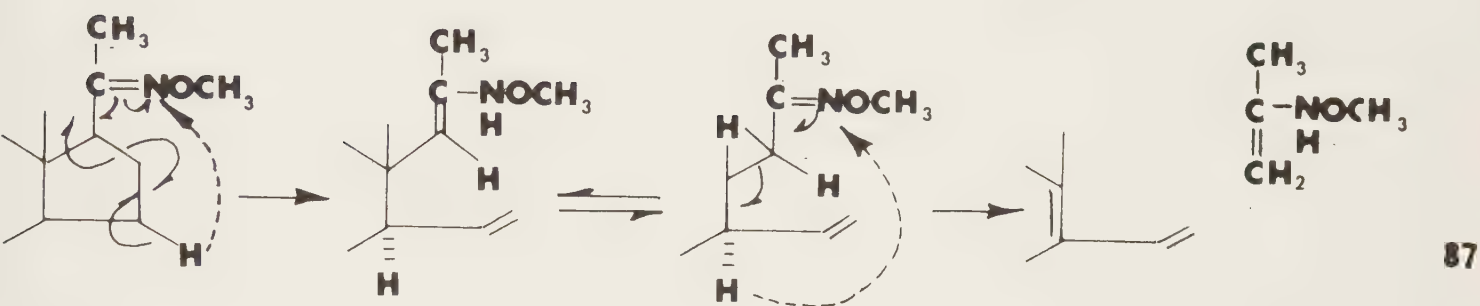
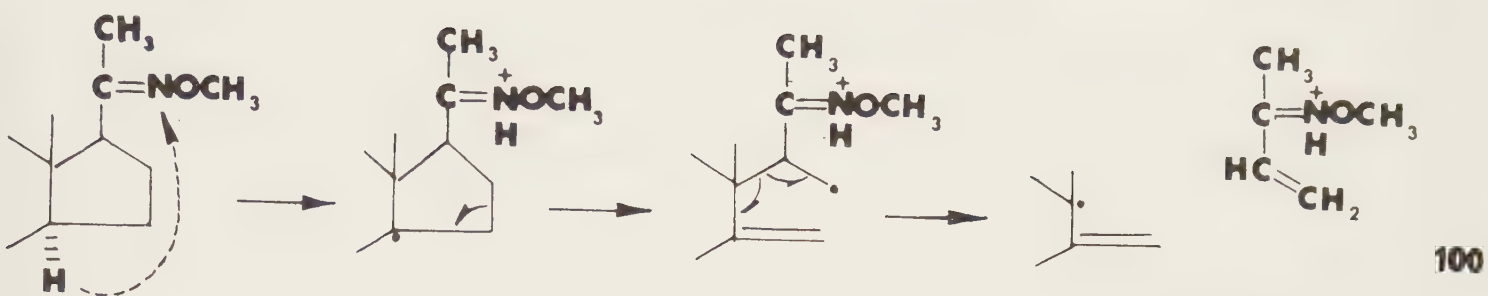


Fig. 7

Transfert du radical hydrogène
expliquant les pics m/e 100 et m/e 87.

- 20-MO : Nous retrouvons (Fig. 5) l'ion moléculaire M^+ 343 et les pics m/e 328 et m/e 312 du 3-MO. Les pics m/e 257 (M-86), m/e 244 (M-99), m/e 100 et m/e 87 correspondent à ceux trouvés après clivages B et C du 3,20 di-MO.

Spectrophotométrie UV.

Lorsque le groupement méthoxime est porté par le carbone 3, il existe un déplacement du $\lambda_{\max}$ vers les plus grandes longueurs d'onde. De plus, ce déplacement est plus important pour l'isomère le plus polaire (b ou d). Le 20-monométhoxime de progestérone a le même $\lambda_{\max}$ que celui de la progestérone (tableau V).

Etude isotopique.

Les 5 dérivés méthoximes de progestérone sont formés à partir de 7α - ^3H -progestérone et de ^{14}C -méthylhydroxylamine. Après séparation chromatographique, le rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ est évalué dans chaque dérivé MO. Les résultats trouvés (tableau VI) est une preuve supplémentaire de l'existence de 3 dérivés mono et de 2 dérivés di-méthoximes de progestérone.

TABLEAU VI

Rapport isotopique $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ calculé et trouvé dans chaque dérivé R.O., après réaction de 7α - ^3H -progestérone (1×10^5 cpm - 3,17 μH) et ^{14}C -méthylhydroxyalmine ($0,9 \times 10^5$ cpm - 7,41 μg) et séparation par chromatographie en couche mince sur alumine dans le benzène.

Spots	^3H	^{14}C	Rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$	
			Trouvé	Calculé
a	164	128	1,28	1,30
b	174	130	1,33	1,30
c	115	45	2,56	2,60
d	52	20	2,74	2,60
e	1 1017	396	2,56	2,60
f	691		∞	∞

2 - Méthoximes d'androst-4-ène-3,17-dione

Etudes chromatographiques.

La chromatographie en couche mince sur alumine dans le mélange benzène, dichlorométhane 1/1 (syst. CM₇, p 70) a montré l'existence possible de 5 dérivés MO : les dérivés a et b correspondent aux isomères du 3,17-di-MO, les dérivés c et d aux isomères du 3-MO et le dérivé e au 17-MO (tableau VII)..

La chromatographie en phase gazeuse sur SE 30 - 3% à 230°C à différents temps de la réaction n'a montré que 3 pics supplémentaires à celui de l'androst-4-ène-3,17-dione. L'utilisation de la phase XE 60 - 2 % avec une colonne de 8 pieds et à 190°C a fait apparaître 2 dérivés dans chacun des pics II et IV (tableau VII). L'étude cinétique (Fig. 8) a montré une formation rapide du 3-MO (pic II) et sa décroissance très lente après 60 mn ; le 17-MO (pic III) est peu important et le di-MO (pic IV) augmente lentement. Au bout de 150 mn, on retrouve en quantité égale les dérivés di-MO et 3-MO. La transformation est donc plus lente que dans le cas de la progestérone.

Spectrométrie de masse (Fig. 9 à 11 et tableau VII).

On note le même déplacement vers les plus grandes longueurs d'onde du $\lambda_{\max}$ lorsque la cétone en 3 a réagi (l'isomère 3-MO le plus polaire sur alumine ayant un $\lambda_{\max}$ plus élevé, tableau VII)..

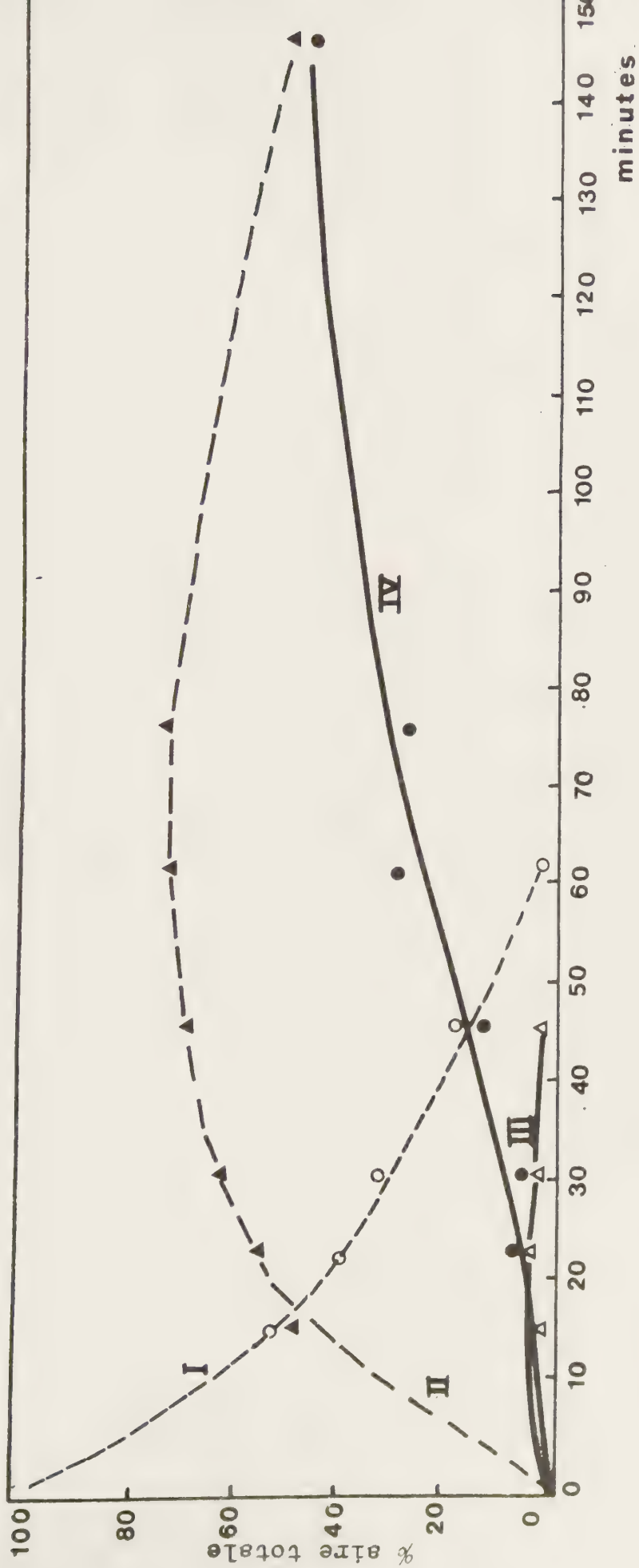


Fig. 8

Etude cinétique de formation des méthoximes de 4-androstène-3,17-dione, suivie par chromatographie gazeuse sur SE 30, température 230° :

- I - 4-androstène-3,17-dione
- II - dérivé 3-MQ
- III - dérivé 17-MO
- IV - dérivé 3,17-diMO

TABLEAU VII

Méthoximes de androst-4-ène-3,17-dione
Critères chromatographiques, spectre UV (λ max) et spectre de masse.

Structure	CCM ⁺		CPG ⁺⁺		λ max m μ	Principaux pics de masse (m/e)							
	Spot	Rf	Pic	SE 30		XE 60	M	Fragmentation					
								-CH ₃	-OCH ₃	D	E	F	G
Andro-3,17-diMO	a	0,60	IV	1,30	0,356	248	344	329	313	153	151	137	125
	b	0,49		1,30	0,359	251							
Andro-3-MO	c	0,39	II	1,09	0,517	248	315	300	284	153	151	137	125
	d	0,26		1,09	0,524	251							
Andro-17-MO	e	0,16	III	1,17	0,632	240	315	300	284				
Androstènedione	f	0,05	I	1,00	1,000	240	286	271					124

⁺ CCM : Chromatographie en couche mince sur alumine (benzène : dichlorométhane 1/1)

⁺⁺ CPG : Chromatographie en phase gazeuse - SE 30 - 3%, 6 pieds, temp. 230°

- XE 60 - 2%, 8 pieds, temp. 190°

⁺⁺⁺ TRR : Temps de rétention relatif

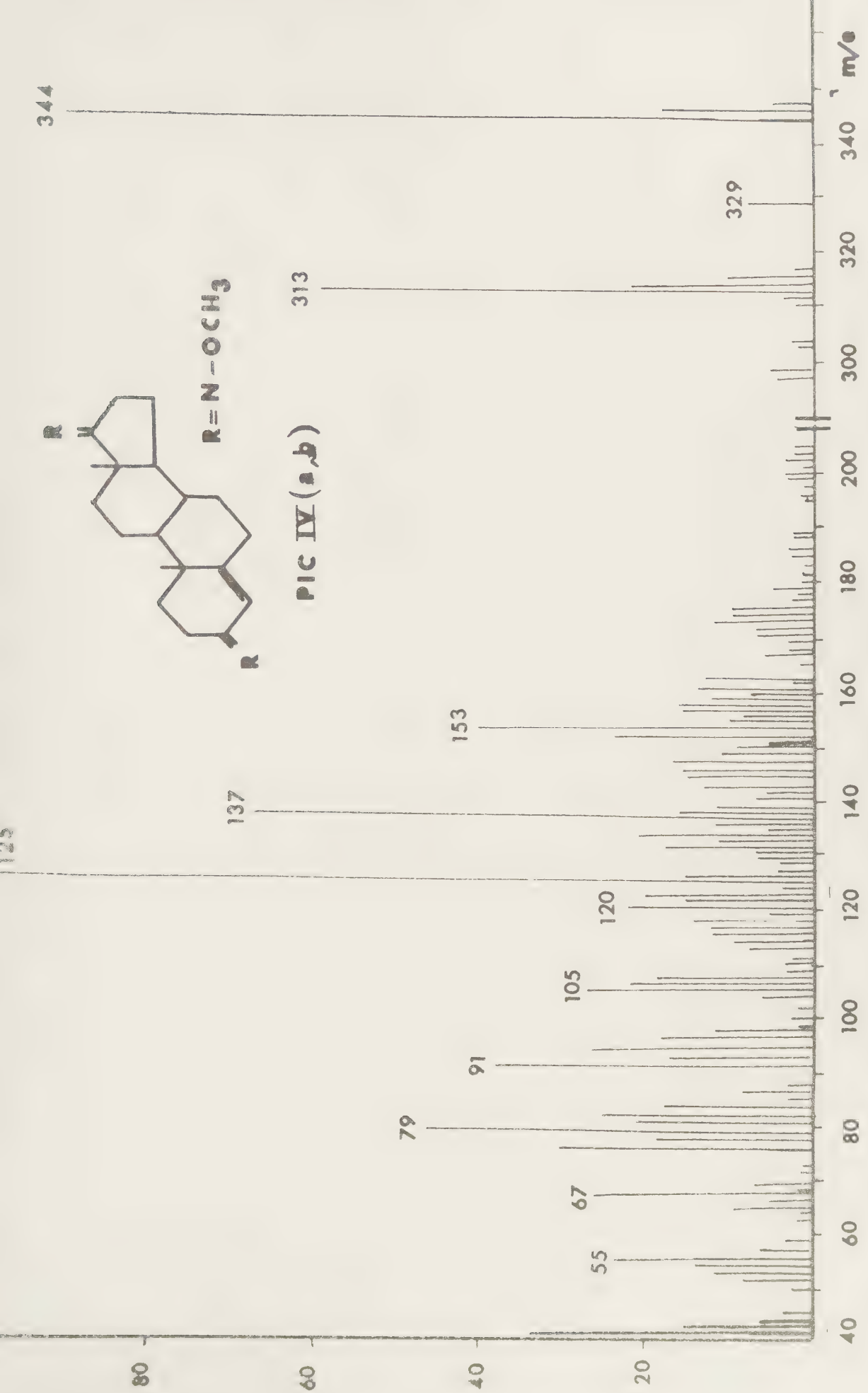
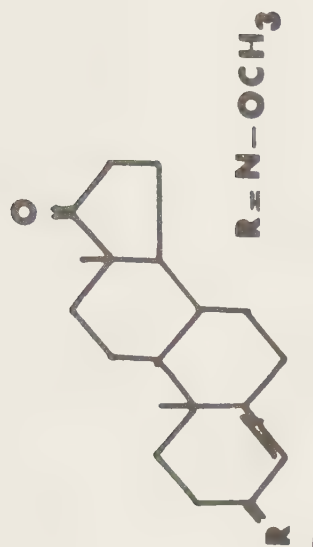


Fig. 9

Spectre de masse du 3,17-diMO de 4-androstène-3,17-dione, obtenu à partir du pic IV après chromatographie gazeuse sur SE 30, ou des spots a et b après chromatographie en couche mince.



PIC II (c,d)

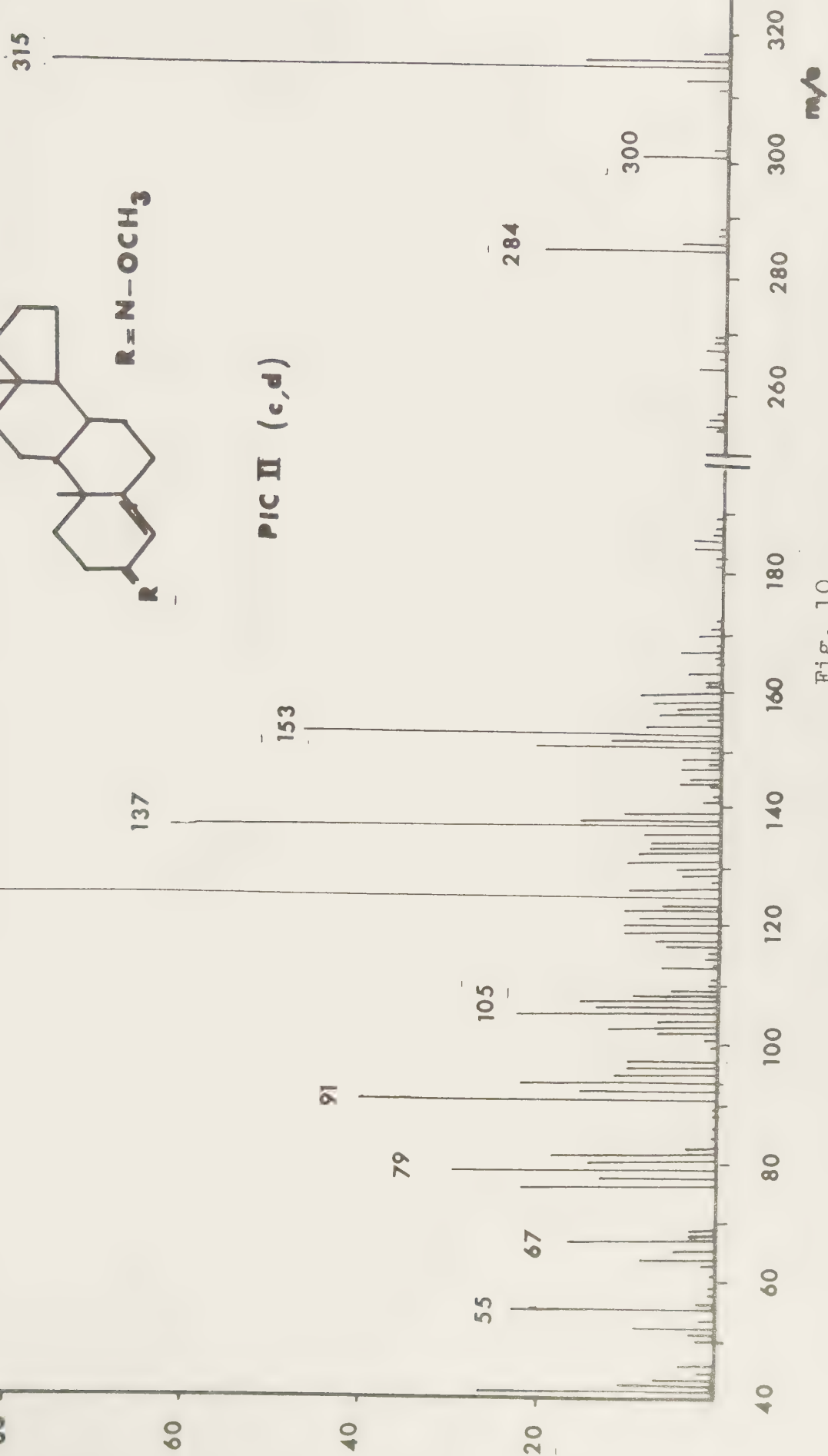
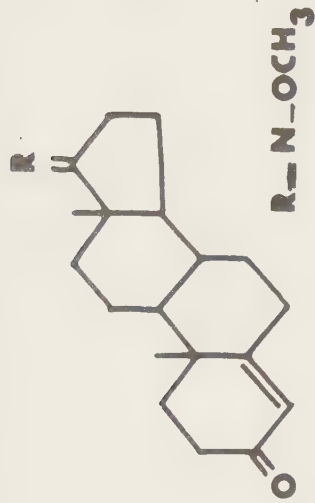
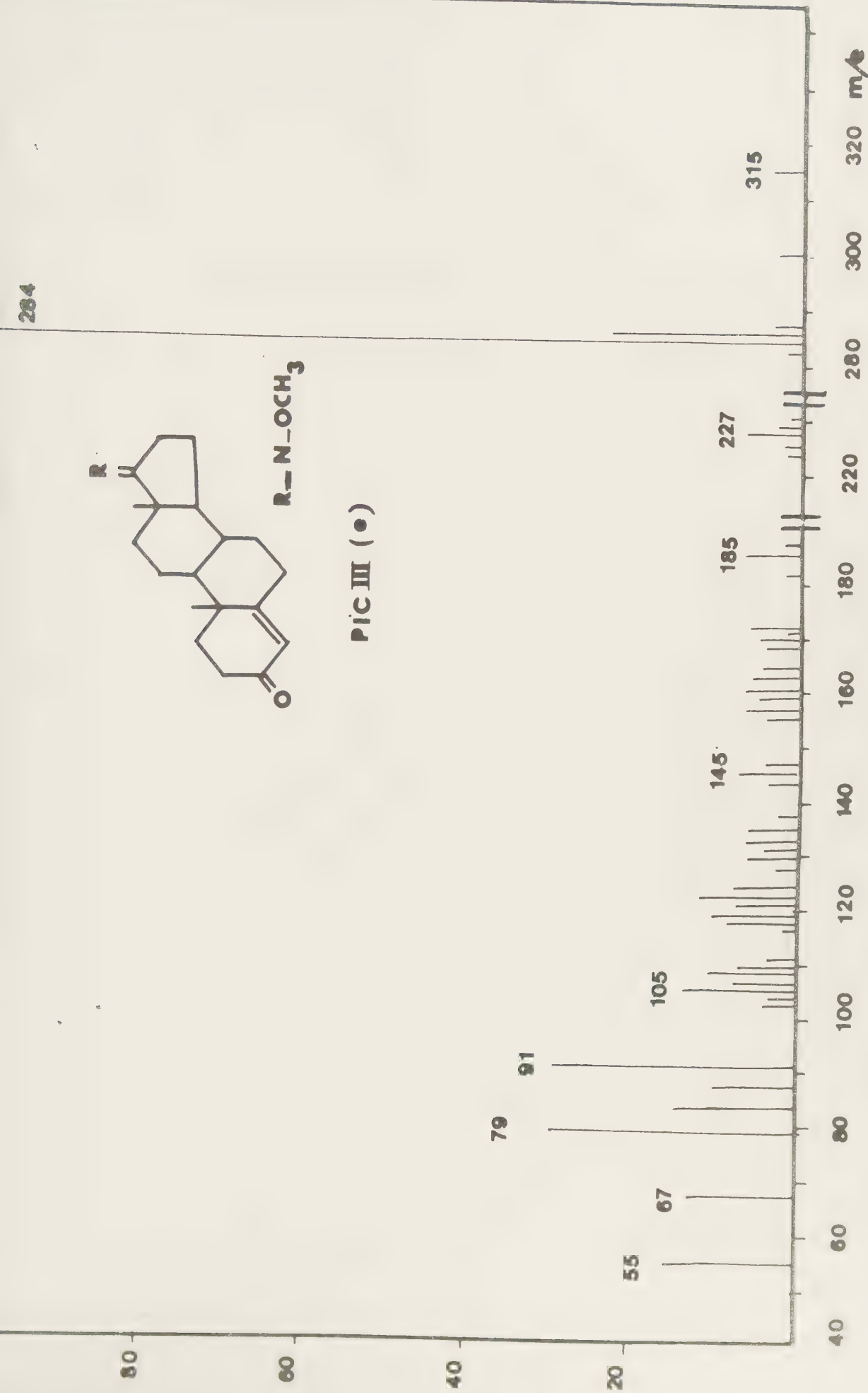


Fig. 10

Spectre de masse du 3-MO de 4-androstène-3,17-dione, obtenu à partir du pic II après chromatographie gazeuse sur SE 30, ou des spots c et d après chromatographie en couche mince.



PIC III (•)

Fig. 11

Spectre de masse du 17-MQ de 4-androstène-3,17-dione, obtenu à partir du pic III après chromatographie gazeuse sur SE 30, ou du spot e après chromatographie en couche mince.

3 - Méthoximes de testostérone

Etudes chromatographiques (tableau VIII).

La chromatographie en couche mince sur silicagel ou sur alumine a montré l'existence de 2 dérivés a et b, qui sont les isomères syn et anti du 3-MO de testostérone (110, 111).

La chromatographie en phase gazeuse sur SE 30 3% à 230°C n'a pas permis de séparer les 2 dérivés MO, alors que leur séparation est complète sur XE 60 à 200°C (Fig. 12).

L'étude cinétique a été faite d'une part en chromatographie gazeuse sur SE 30 où nous avons constaté que 50 % de la testostérone ont été consommés en 20 mn et la totalité en 90 mn, d'autre part en chromatographie en couche mince sur silicagel après addition de testostérone tritiée au temps T_0 de la réaction : au bout de 120 mn, nous avons retrouvé 52,4 % de l'isomère a le moins polaire, 46,3 % de l'isomère b et 1,3 % de testostérone (Fig. 13).

Spectrométrie de masse (Fig. 14).

Les isomères a et b du 3-MO ont le même spectre de masse et le tableau VIII indique le rapport m/e des fragments obtenus.

Méthoximes de testostérone

Critères chromatographiques, spectre UV (λ_{max}), point de fusion et spectre de masse

+ CCM : Chromatographie en couche mince

- I : silicagel (hexane, acétate d'éthyle 3/2)
- II : alumine (dichlorométhane)

++ CPG	: Chromatographie en phase gazeuse	- SE 30 - 3 %	6 pieds,	temp. 230°
		- XE 60 - 2 % <td>8 pieds, <td>temp. 200°</td> </td>	8 pieds, <td>temp. 200°</td>	temp. 200°

+++ PF : Point de fusion

++++
TRR : Temps de rétention relatif

Front ——— Rf	Front ——— Rf
(a) 0,70	(a) 0,39
(b) 0,60	(b) 0,29
(c) 0,45	(c) 0,16
Origine ——— 0,00	Origine ——— 0,00
Silicagel-benzène AE 3/2	Alumine-CH ₂ Cl ₂

Chromatographie en couche mince

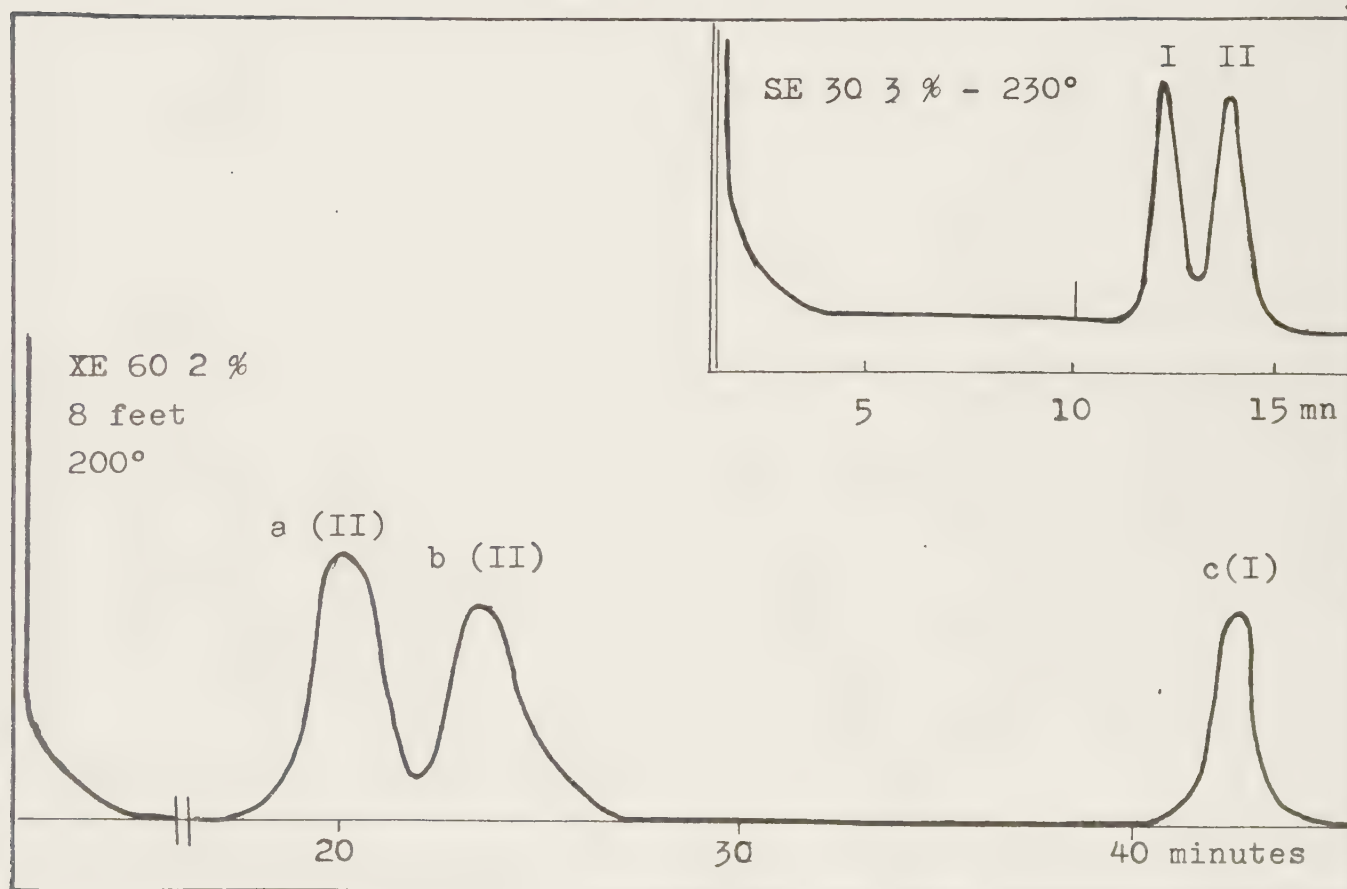
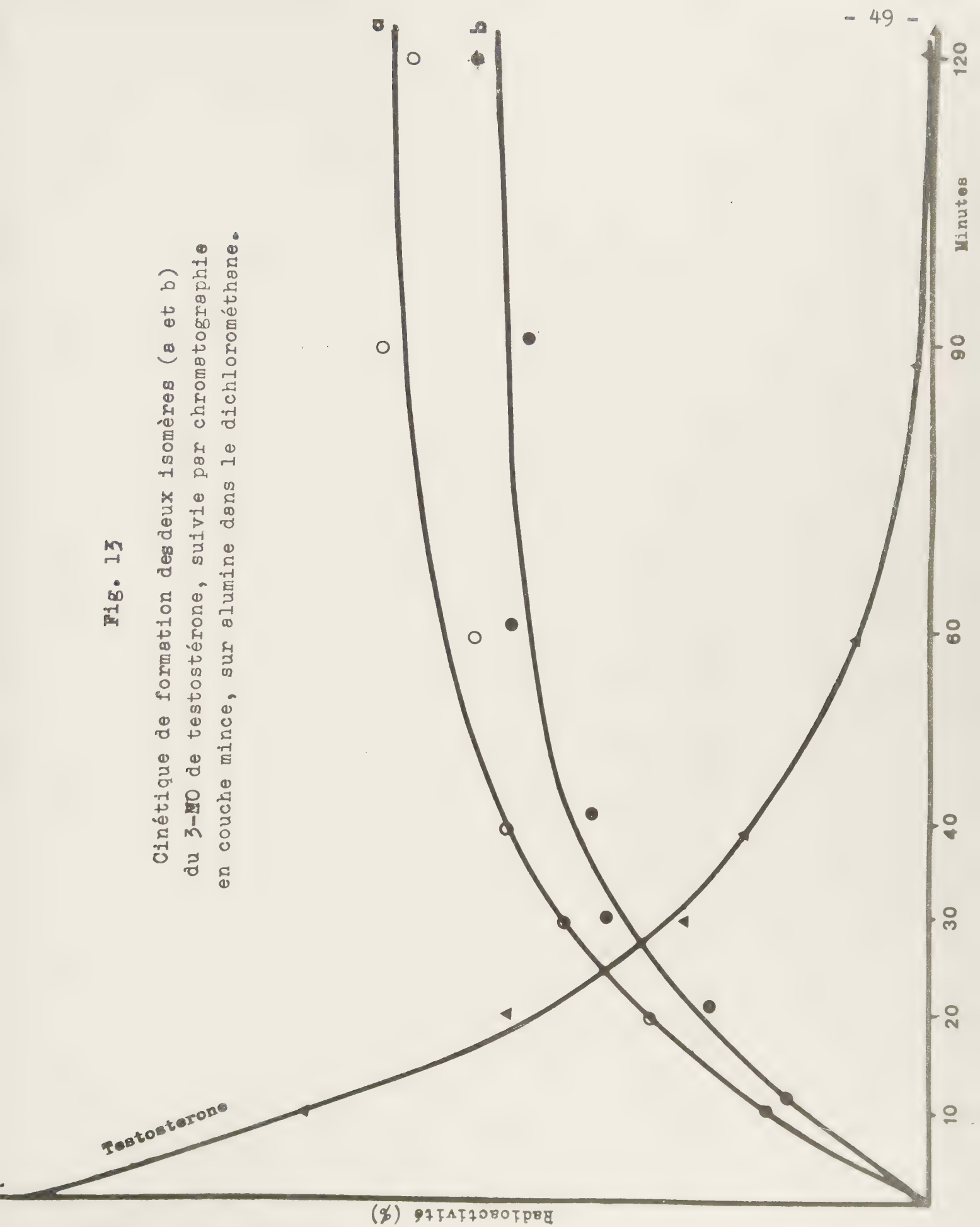


Fig. 12

Chromatographies en couche mince sur silicagel et sur alumine et chromatographies en phase gazeuse sur SE 3Q et sur XE 60 de la testostérone (pics I et c), des isomères du 3-MO de la testostérone (pics II, a et b).

Fig. 13

Cinétique de formation des deux isomères (a et b)
du 3- α -MO de testostérone, suivie par chromatographie
en couche mince, sur alumine dans le dichlorométhane.



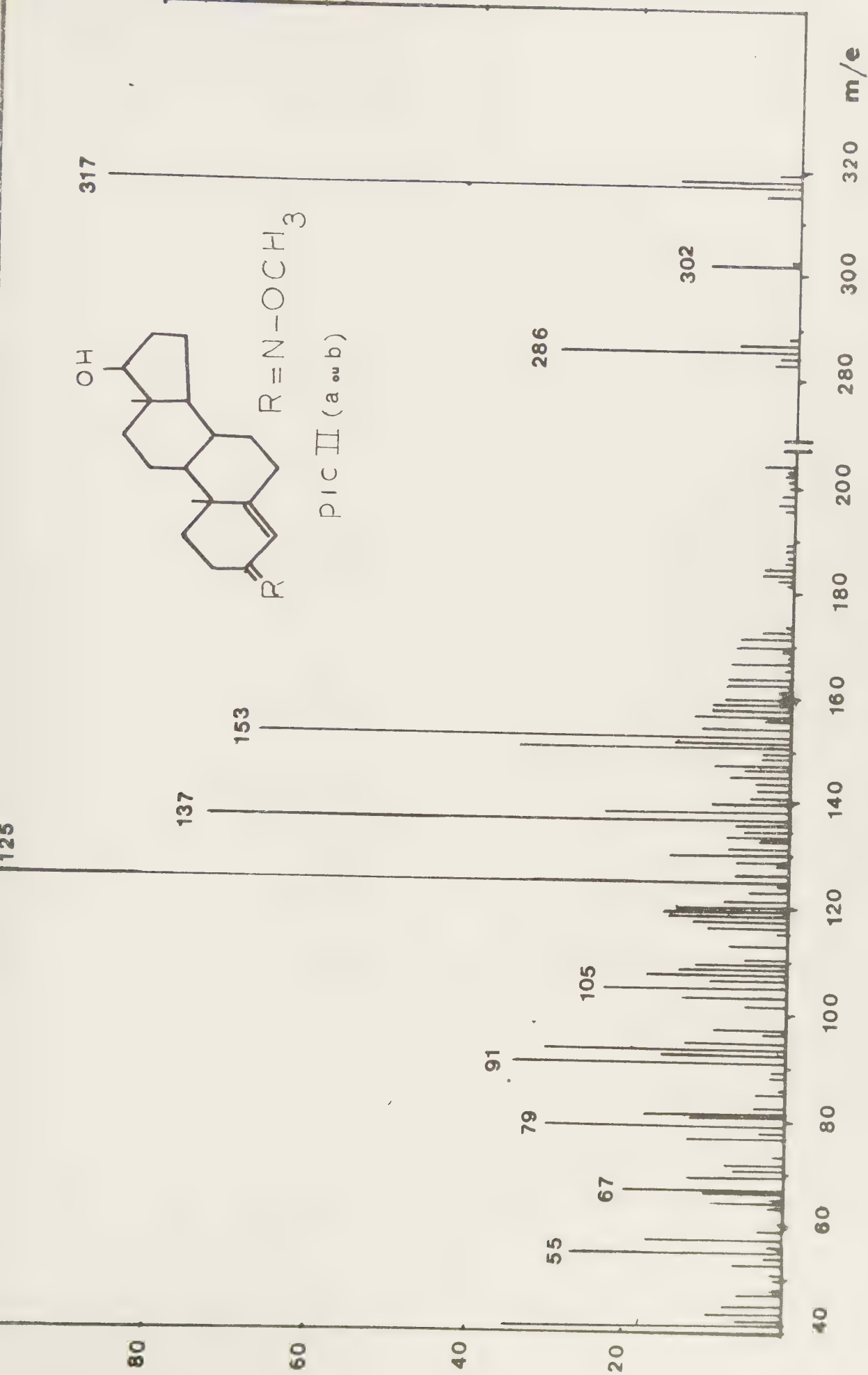


Fig. 14

Spectre de masse du 3-MO de testostérone, obtenu à partir du pic II après chromatographie gazeuse sur SE 30 ou des spots a ou b après chromatographie en couche mince.

Spectre infrarouge.

Nous avons fait réagir 50 mg de testostérone avec 75 mg de réactif dans 5 ml de pyridine. Au bout de 3 h, nous avons ajouté 25 ml d'acétone, l'extrait est évaporé sous vide à 40°C puis chromatographié sur une colonne de 50 g de célite (phase stationnaire, nitrométhane-méthanol 1/1 - phase mobile, cyclonexane 2). Les 2 isomères ont été élués dans le 2ème volume de rétention. Leur séparation, amorcée dans le système précédent, a été achevée par chromatographie préparative en couche mince sur alumine dans le dichlorométhane. Chaque dérivé a été recristallisé dans le méthanol, sa pureté vérifiée en chromatographie gazeuse et son point de fusion non corrigé, établi (tableau VIII). Les spectres IR dans KBr des 2 isomères sont très voisins. Cependant des différences peuvent être montrées dans les régions $820-850\text{ cm}^{-1}$ et $920-950\text{ cm}^{-1}$ (Fig. 15 et 16).

Spectrophotométrie UV.

Le dérivé le plus polaire b présente un pic étalé et le λ_{max} le plus élevé (tableau VIII).

Interconversion des isomères du 3-MO.

Les isomères syn et anti du 3-MO sont stables, sous forme cristallisée. Chacun d'eux, mis en solution dans différents solvants : benzène, acétate d'éthyle, acétone, chloroforme et dichlorométhane, et chromatographié en phase gazeuse sur XE 60 à 200°C, montre une transformation isomérique $< 1\%$. Par contre la chromatographie en couche

mince sur silicagel ou sur alumine dans le benzène, l'acétate d'éthyle, le chloroforme ou le dichlorométhane entraîne une isomérisation importante. Le fait a été vérifié avec tous les stéroïdes utilisés possédant une cétone en 3. Avec la testostérone, la transformation du dérivé (a) le moins polaire dans l'autre est de 9,7 % et celle du dérivé (b) le plus polaire dans l'autre est de 13,5 %. Ces transformations sont différentes de celles observées avec les isomères 2,4-dinitrophénylhydrazones, où l'isomérisation syn/anti qui apparaît dans les solvants chlorés et dans le benzène est caractérisée par un réarrangement des formes les plus polaires vers les formes les moins polaires (111).

4 - Méthoximes de divers stéroïdes naturels.

Les tableaux IX et X indiquent d'une part le nombre maximum de dérivés MO obtenus dans les conditions décrites et d'autre part le temps nécessaire pour transformer 50 % du substrat (T 1/2) selon les modalités de réactions habituelles.

5 - Méthoximes de stéroïdes modèles.

Le tableau XI indique la nature du stéroïde utilisé, et le nombre de dérivés MO obtenus en fonction du système chromatographique utilisé. Le dérivé MO du composé (1) n'a présenté également qu'un seul pic en chromatographie gazeuse sur XE 60 2 % à 200°C et qu'un seul spot en couche mince sur alumine dans benzène, dichlorométhane, 1/1.

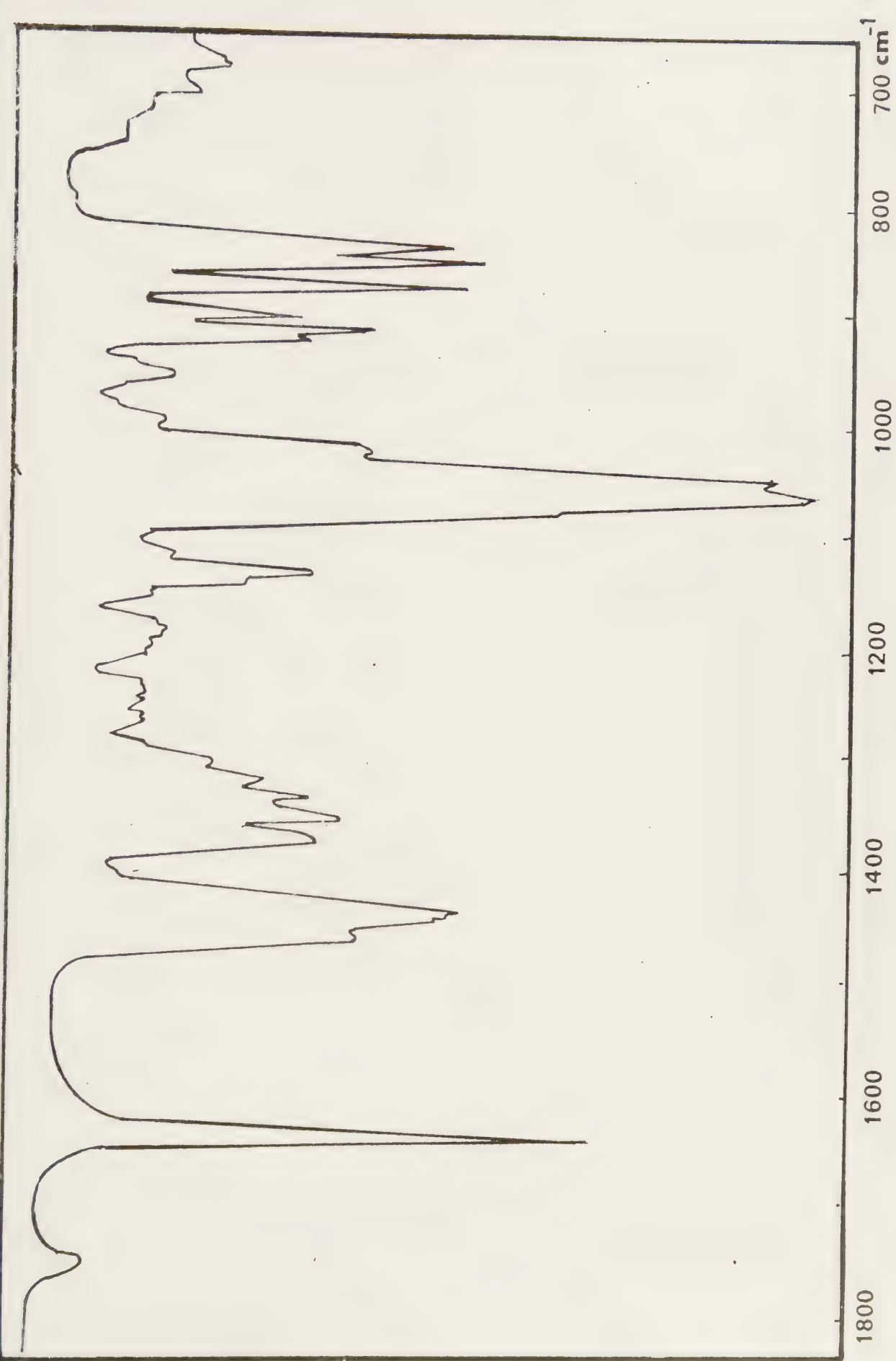


Fig. 15

Spectre infrarouge dans KBr de l'isomère α du 3-MO de testostérone

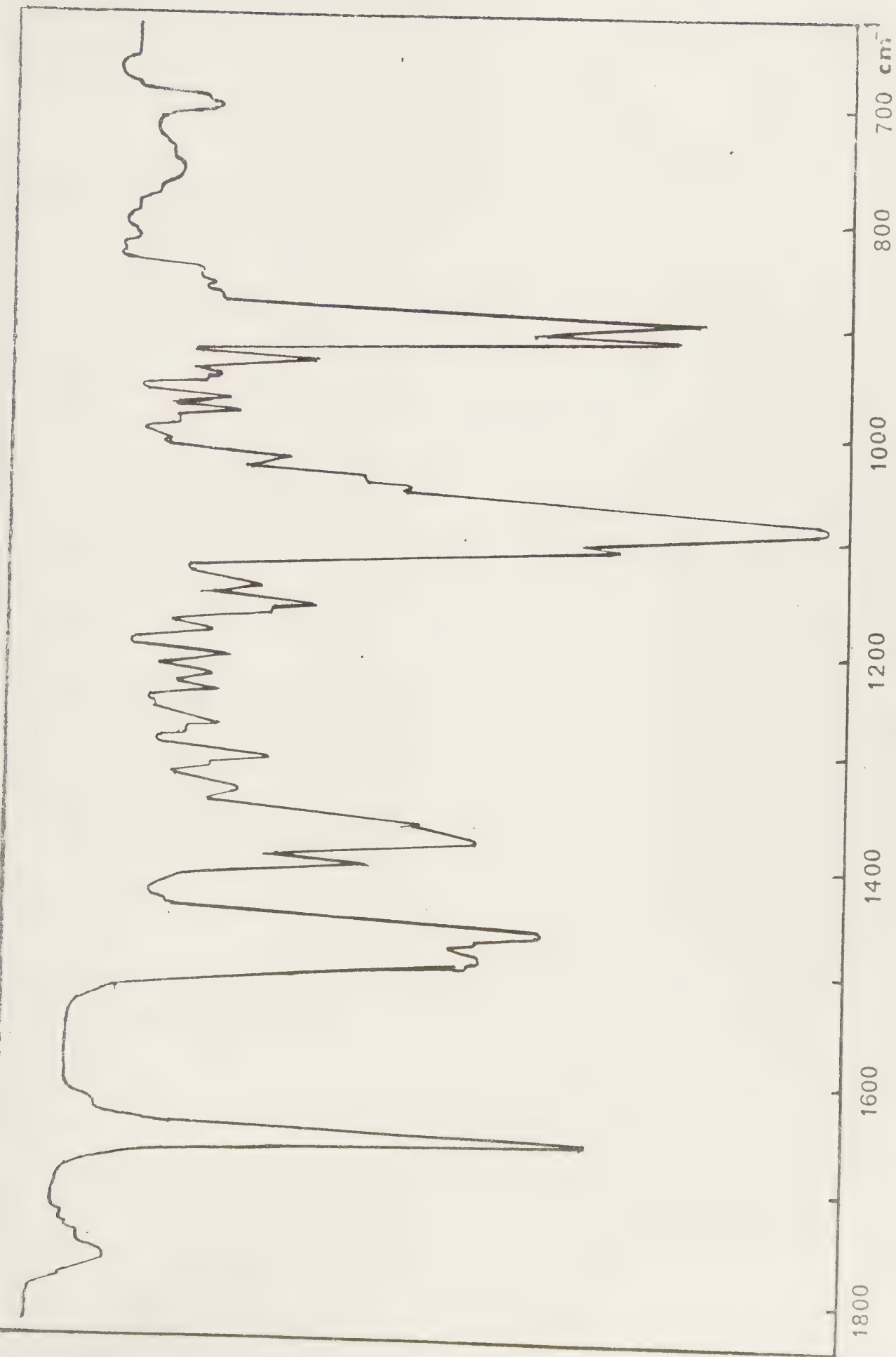


Fig. 16

Spectre infrarouge dans KBr de l'isomère b du 3-MO de testostérone

TABLEAU IX

Méthoximes possibles (MO) de différents céto-stéroïdes et temps (T 1/2) pour transformer 50 % de chaque composé en dérivé (s) méthoxime (s)..

Structure	MO	T 1/2
<u>3-céto-Δ^4</u>		
17 β -hydroxyandrost-4-en-3-one (testostérone)	2	15 - 20 minutes
17 α -hydroxyandrost-4-en-3-one (epitestostérone)	2	"
Acétate de testostérone	2	"
Acétate d'epitestostérone	2	"
20 α -hydroxypregn-4-en-3-one	2	"
<u>4-céto.</u>		
17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-one	2	15 - 20 minutes
17 β -hydroxy-5 β -androstan-3-one	2	"
<u>16-céto..</u>		
3,17 β -dihydroxyestra-1,3,5 (10)-trien-16-one	1	$\simeq$ 1 heure
<u>17-céto</u>		
3 β -hydroxyandrost-5-en-17-one	1	> 1 heure

TABLEAU IX (suite)

Structure	MO	T 1/2
3 α -hydroxy-5 α -androstan-17-one (androstérone)	1	1 heure
3 α -hydroxy-5 β -androstan-17-one (etiocholanolone)	1	1 heure
3-hydroxyestra-1,3,5, (10)-trien-17-one (estrone)	1	12 - 15 heures
<u>20-céto.</u>		
3 β -hydroxypregn-5-en-20-one (5-pregnénolone)	1	5 - 10 minutes
<u>3,17-dicéto-Δ^4</u>		
androst-4-ene-3,17-dione	5	15 - 20 minutes
<u>3,17-dicéto.</u>		
5 α -androstane-3,17-dione	5	15 - 20 minutes
5 β -androstane-3,17-dione	5	"
<u>3,20-dicéto.</u>		
pregn-4-ene-3,20-dione (progestérone)	5	15 - 20 minutes

TABLEAU X

Méthoximes (MO) de 17 β -hydroxy-5 α /5 β -androstan-3-one et
5 α /5 β -androstan-3,17-dione après chromatographie en
couche mince : valeurs des Rf.

	Silicagel		Alumine
	I	II	Benzène
17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-one	0,56	0,26	0,18
MO (a)	0,73	0,47	0,34
" (b)	0,66	0,38	0,23
17 β -hydroxy-5 β -androstan-3-one	0,55	0,19	0,13
MO (a)	0,68	0,41	0,32
" (b)	0,60	0,30	0,21
5 α -androstan-3,17-dione			0,15
MO (a)			0,65
" (b)			0,52
" (c)			0,45
" (d)			0,35
" (e)			0,32
5 β -androstan-3,17-dione			0,16
MO (a)			0,63
" (b)			0,49
" (c)			0,41
" (d)			0,36
" (e)			0,34

Silicagel : I (benzène, acétate d'éthyle 3/2)
II (hexane, acétate d'éthyle 7/3)

Formule	Structure	CCM	MO	Rf
1	3α,11β-dihydroxy-18-norandrostane-17-one	Silicagel Benzène-Acétate d'éthyle 3/2	1	0,33
2	pregnane-4,16-diene-3,20-dione	Alumine (Benzène)	5	0,10 0,26 0,44 0,75 0,80
3	pregnane-4,9,11-triene-3,20-dione	Alumine (Benzène)	5	0,16 0,30 0,45 0,56 0,70
4	androsta-4,9,11-triene-3,20-dione	Alumine (Benzène)	5	0,57 0,47 0,43 0,40 0,28
5	18-norpregn-16-ène-3,11,20-triène-3-éthylène acétal	Alumine Benzène-dichloro- méthane 1/1	3	0,36 0,17 0,14

DISCUSSION

1 - Nombre réel de méthoximes.

Le nombre de dérivés MO constatés dans les conditions de formation décrites dépend des systèmes chromatographiques utilisés et du temps de réaction.

En chromatographie en phase gazeuse, l'emploi de la phase non sélective SE 30 ne permet pas de séparer les isomères du 3-MO. Avec une phase sélective comme XE 60, l'emploi d'une colonne de 6 pieds et à la température $\approx 230^{\circ}\text{C}$, n'est pas efficace ; leur séparation a été généralement possible avec XE 60 mais avec une colonne de 8 pieds et à une température $\approx 200^{\circ}\text{C}$.

L'utilisation de systèmes chromatographiques variés nous a permis de constater que tous les 3-cétostéroïdes testés donnent 2 isomères : notamment le 17 β -hydroxy-5 β -androstane-3-one et le 5 β -androstane-3,17-dione. La seule exception récemment constatée par Horning et al. (111) concerne la fonction cétone de deux stéroïdes de la série 5 β -cholestane (5 β -cholestan-3-one et le 5 cholestèn-3-one) : on n'observe qu'un seul dérivé méthoxime.

Le nombre de méthoximes décelables dépend également du temps de réaction. En effet, certains dérivés MO ont une existence éphémère : c'est le cas des mono-méthoximes de progestérone et d'androstènedione : le 3-MO persistant plus longtemps que le 17 ou le 20-MO.

2 - Eléments d'identification d'une fonction cétone.

La preuve d'un seul dérivé MO, après des essais dans différents systèmes chromatographiques, laisse supposer que ce n'est pas la 3-cétone qui a réagi (exception faite de la 3 cétone de la série 5 β -cholestane). Nous n'avons pas vérifié le comportement de la 3-cétone lorsqu'il existe différents groupements fonctionnels supplémentaires dans le noyau A (seul le 2 α -fluoro-testostérone a été testé : il se forme également 2 isomères).

L'apparition précoce et éphémère de dérivés MO dans une étude cinétique, fait admettre l'existence de monométhoximes intermédiaires, donc d'un stéroïde ayant au moins 2 fonctions cétones réactives.

L'étude cinétique peut fournir d'utiles renseignements au sujet de la position de la cétone dans la molécule de stéroïde. En effet le temps ($T_{1/2}$) nécessaire pour transformer à la température du laboratoire 50 % du stéroïde est très différent suivant la place de la cétone : la 20-cétone est la plus réactive ($T_{1/2} \simeq 10$ mn), la moins réactive est la 17-cétone ($T_{1/2} \simeq 1$ h), la 3-cétone étant intermédiaire ($T_{1/2} = 15$ à 20 mn).

Enfin dans le cas d'un stéroïde ayant 2 cétones réactives dont l'une est conjuguée, l'étude du spectre d'absorption dans l'UV permet de savoir si la cétone conjuguée a réagi ou non.

3 - Etude de l'encombrement stérique.

Les 11-cétostéroïdes ne forment pas de dérivés MO, même après chauffage à 100°C pendant une nuit (107). La formation de plus d'un dérivé MO à partir d'un stéroïde 18-nor-11,20-dicétonique (cas n°5 du tableau XI), prouve que la 11-cétone peut réagir en l'absence du méthyl porté par le carbone 13 : l'existence de **seulement 3** dérivés dans ce cas, fait supposer, bien que ceci n'ait pas été vérifié par spectrométrie de masse, qu'il s'agit du 11-MO, du 20-MO et du 11,20-di-MO. Nous n'avons pu d'autre part montrer, lorsque la 11 cétone est réactive, l'existence d'isomères 11-MO.

L'utilisation d'autres stéroïdes modèles possédant une double liaison dans le voisinage de la fonction cétone portée par le carbone 17 ou 20 (composés 2, 3 et 4 du tableau XI) a fourni le même nombre de méthoximes que le stéroïde normal correspondant. La diminution de l'encombrement stérique ainsi réalisée n'a pu permettre la formation d'isomères du méthoxime en 17 ou en 20.

Un cas intéressant est celui de la 16-cétone de la 3 β -hydroxy-5 α -androstan-16-one, qui donne 2 dérivés isomères (111) : l'introduction d'un groupe 17 β -OH, comme dans la 16-céto-oestradiol entraîne un encombrement stérique car il n'a pas été possible, malgré l'utilisation de plusieurs systèmes chromatographiques, de retrouver deux dérivés isomères.

4 - Intérêt des dérivés MO dans l'analyse de stéroïdes.

La stabilité et la facilité d'obtention des dérivés MO permettent leur large utilisation, comme procédé de purification, suivant que l'on veut conserver ou éliminer les dérivés MO formés, dont le comportement chromatographique est très différent du ou des stéroïde(s) cétonique(s) ayant servi de substrat. Ce comportement chromatographique différent a été mis à profit dans les microdosages par double dilution isotopique (^{113} , ^{110}) des stéroïdes alcooliques possédant une fonction cétone réactive : dans le cas de la testostérone ou de l'épitestostérone acétylée par l'anhydride acétique, on obtient les 2 isomères 3-MO en proportion sensiblement égale : la valeur identique du rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ dans chaque isomère est un critère supplémentaire de pureté. Enfin le chlorhydrate de O.méthylhydroxylamine radioactive (^3H ou ^{14}C) pourrait être utilisé comme indicateur interne dans les dosages par double dilution isotopique des stéroïdes cétoniques, dépourvus de fonction alcool acétylable, comme dans l'expérience de la Fig. 6.

CHAPITRE III

TESTOSTERONE ET EPITESTOSTERONE (formes libres et sulfates)

ETUDES METABOLIQUES

METHODOLOGIE

A - Méthodologie générale.

1 - Matériel chimique.

- Solvants organiques : de qualité pure, pour analyses, redistillés selon les techniques conventionnelles (114).

- Stéroïdes non radioactifs : nomenclature, appellations courantes, abréviations, origine :

Steroides libres :

17 β -hydroxyandrost-4-èn-3-one, testostérone (T) - UCLAF

17 α -hydroxyandrost-4-èn-3-one, épitestostérone (EpiT) -
MAN RESEARCH

3 β -hydroxy-5-androstèn-17-one, déhydroépiandrostérone
(DHA, D) - UCLAF.

Androst-4-èn-3,17-dione, androstènedione (Δ) - UCLAF

3 α -hydroxy-5 α -androstàn-17-one, androstérone (A) - UCLAF

3 α -hydroxy-5 β -androstàn-17-one, 5 β -androstérone ou
étiocholanolone (5 β -A, E) - UCLAF.

3 β -hydroxy-5 α -androstàn-17-one, épiandrostérone - FLUKA.

Androsta-1,4 diène-3,17-dione, - UCLAF.

17 β -hydroxy-androst-1,4-dièn-3-one, - UCLAF.

17 α -hydroxy-androst-1,4-dièn-3-one, - UCLAF.

5 β -androstane-3,17-dione, - UCLAF.

5 α -androstane-3,17-dione, - UCLAF.

5 α -androstane-3 α ,17 β -diol, 5 α -A-3 α ,17 β -diol - UCLAF.

5 β -androstane-3 α ,17 β -diol, 5 β -A-3 α ,17 β -diol - UCLAF.

5 α -androstane-3 β ,17 β -diol, 5 α -A-3 β ,17 β -diol - UCLAF.

5 α -androstane-3 α ,17 α -diol, 5 α -A-3 α ,17 α -diol -

5 β -androstane-3 α ,17 α -diol, 5 β -A-3 α ,17 α -diol - Préparé au
Laboratoire.

5 α -androst-16-èn-3 α -ol, An (α) - Préparé au Laboratoire.

5 α -androst-16-èn-3 β -ol, An (β) - IKAPHARM.

5 β -androst-16-èn-3 α -ol, Ae (α) - IKAPHARM.

Androsta-4,16 dièn-3-one, Diènone - IKAPHARM.

Tous les stéroïdes utilisés ont été recristallisés
et leur point de fusion trouvé conforme à celui donné dans
la littérature.

Stéroïdes conjugués :

Glucuronides, β -D-glucopyranuronoside (G).

Sulfates, ester-sulfates (S).

Les sulfates de testostérone (ST) et d'épitestostérone (S-EpiT) ont été préparés au Laboratoire.

Substances radioactives.

- Stéroïdes.

1,2 ^3H -épitestostérone, (^3H -EpiT) - Préparé par M. Gut
Worcester Foundation for Experimental Biology.
(Activité spécifique 85 Ci/mg).

1,2 ^3H -testostérone, (^3H -T) - New England Nuclear Corp.
(Activité spécifique $\approx$ 50 Ci/mM).

4- ^{14}C -testostérone, (^{14}C -T) - New England Nuclear Corp.
(Activité spécifique 51 mCi/mM).

4- ^{14}C -androstènedione, (^{14}C - Δ) - Préparé au Laboratoire
par oxydation chromique de 4- ^{14}C -T

4- ^{14}C -épitestostérone, (^{14}C -EpiT) - Préparé au Laboratoire

Sulfate de ^3H ou ^{14}C -épitestostérone, (S- ^3H -EpiT ou
S- ^{14}C -EpiT) - Préparé au Laboratoire.

7 α - ^3H -déhydroépiandrosterone, (^3H -D) - New England Nuclear
Corp. (Activité spécifique $\approx$ 30 Ci/mM).

Tous les stéroïdes radioactifs libres sont conservés à +4°C dans le benzène. Tous les sulfates de stéroïdes radioactifs sont conservés à +4°C dans un mélange benzène/méthanol 1/1.

Ils sont purifiés au maximum 48 h avant toute expérience métabolique dans les systèmes chromatographiques appropriés

- Anhydride acétique.

^3H -anhydride acétique en solution dans le benzène à 15 %
New England Nuclear Corp. (NEN) (Activité spécifique 100 mCi/mM) purifiée par deux distillations successives sous vide, quelques heures avant l'emploi.

^{14}C -anhydride acétique en solution dans le benzène à 15 %
obtenu fraîchement distillé du Commissariat à l'Energie Atomique dont l'activité spécifique variait selon les besoins de 1 à 29 mCi/mM.

L'activité spécifique réelle de ces différents lots d'anhydride acétique a été testée selon la technique de Kliman (115) par acétylation de cortisol non radioactif et détermination de l'activité spécifique de l'acétate de cortisol.

2 - Matériel Biologique.

Les différentes études présentées dans ce travail ont été réalisées à partir du sang ou des urines.

Sang : les concentrations et les clearances métaboliques des stéroïdes ont été déterminées à partir du plasma. A cet effet, le sang veineux, recueilli sur une goutte d'héparine, a été centrifugé dans un délai ne dépassant pas une heure ; le plasma décanté, a été conservé à -20°C , lorsqu'il n'a pu être traité le jour même.

Urines : les expériences métaboliques ont été réalisées toujours selon le même protocole : l'injection du ou des stéroïde(s) radioactif(s) est faite le matin, le sujet ayant uriné, puis les urines sont recueillies en totalité dans un bocal de 2 litres, contenant de l'acide mercuri-thiosalicylique : le recueil, par tranche de 24 h, est poursuivi pendant plusieurs jours, en général 3 à 4 jours.

3 - Systèmes chromatographiques utilisés.

L'étape chromatographique dans la purification d'un extrait, dans la séparation des stéroïdes est fondamentale. Suivant le problème à résoudre, on peut préférer un système à un autre (partage ou adsorption), un support à un autre (colonne de célite, colonne d'alumine, couche mince sur silicagel ou sur alumine, chromatographie sur papier); un solvant ou un mélange de solvants à un autre. En fait, on a intérêt à utiliser successivement des systèmes très différents : nous l'avons déjà souligné lors de l'étude des méthoximes. Les systèmes utilisés au cours de nos études métaboliques sont les suivants :

- Chromatographie de partage sur colonne de célite 535.

La purification de la célite, la préparation à sec de la colonne sont celles décrites par C. Pidaks (116) et reprises par Siiteri (9). La composition des phases (tableau XII) a été établie en fonction du coefficient de partage des stéroïdes étudiés, du volume de phase(s) stationnaire(s) imprégnant la célite et du volume de phase mobile retenu sur la hauteur de la colonne (volume de rétention ou VR) ; le tableau XII indique les systèmes de solvants utilisés et les stéroïdes testés.

TABLEAU XII

Systèmes de solvants utilisés sur colonne de célite pour différents stéroïdes libres et sulfates

Phase stationnaire		Phase mobile		Stéroïdes	
C ₁	MeOH/H ₂ O, 7/3	Hexane 2 VR	→	Δ	
		Héxane/Benzène, 7/3	→	A, E, D, I, EpiT	
C ₂	Formamide	Hexane 2 VR	→	T, EpiT (acétates), C ₁₉ O ₁	
		Héxane/Benzène, 7/3	→	Δ, A, E, D	
		Héxane/Benzène, 3/7	→	6, EpiT	
C ₃	Diméthyl-formamide	Hexane		T, EpiT (acétates), C ₁₉ O ₁	
C ₄	MeOH/Nitroéthane, 1/1	Cyclohexane, 2		T, EpiT (acétates), C ₁₉ O ₁	
				T, EpiT (MO)	
C ₅	NH ₄ OH, N/BuOH, ter, 5/5	Isooctane, 2		C ₁₉ O ₂ Sulfates	
C ₆	NH ₄ OH, N ₂ BuOH, N/MeOH, 3/1/2	Isooctane/Acétate d'éthyle, 2/4		C ₁₉ O ₂ Sulfates	

- Chromatographie d'adsorption sur colonne d'alumine.

A₁ : gradient d'élution pour les stéroïdes cétoniques, selon une modification de l'appareil de Lakshamanan et al. (117) : alumine Woelm degré 1, hydratée à 4 % pour les stéroïdes cétoniques. Solvants : benzène/éthanol.

A₂ : même gradient, avec une alumine hydratée à 6 % et une plus forte teneur d'éthanol dans le benzène pour les stéroïdes non cétoniques (118).

A₃ : élution selon le procédé de Crépy et al. (119) pour séparer les stéroïdes en 3 fractions : stéroïdes libres, sulfates et glucuronides : l'extrait est déposé dans BuOH,N à 1 %, les libres sortent dans le même solvant, les sulfates dans le BuOH,N à 8 %, les glucuronides dans le BuOH,N saturé de NH₄OH 0,1 N.

A₄ : élution selon Gower et al. (120) pour les stéroïdes peu polaires, notamment les $\Delta^{16}\text{-C}_{19}\text{O}_1$.

- Chromatographie en couche mince.

Nous avons utilisé le silicagel G-F 254 et l'alumine G-F 254. Une bouillie aqueuse (silicagel 30 g, eau 60 ml ; alumine 30 g, eau 50 ml) est étalée rapidement sur une plaque 20 x 20 cm et 0,25 cm d'épaisseur, séchée à la température ambiante pendant 10 mn, puis à 110°C pendant une heure. Les plaques sont conservées dans un dessiccateur. Le dépôt de l'extrait se fait à l'aide d'une pipette Pasteur. La chromatographie est arrêtée

lorsque le solvant atteint le bord de la plaque. Il a été parfois nécessaire de répéter la migration pour obtenir une meilleure séparation (notamment pour la testostérone et l'épitéstostérone sur alumine). La région à éluer est transférée à l'aide d'une spatule dans une pipette Pasteur (diamètre : 1 cm environ) dont l'extrémité effilée est obturée par du coton hydrophile lavé. L'élution est réalisée avec 10 ml d'acétone ou d'acétate d'éthyle. Le rendement d'élution est $\simeq 90\%$. Les systèmes utilisés sont les suivants :

CM ₁	silicagel	benzène/acétate d'éthyle	3/1
CM ₂	"	benzène/acétate d'éthyle	3/2
CM ₃	"	hexane/acétate d'éthyle	1/1
CM ₄	"	benzène/ether	1/1
CM ₅	"	benzène/ether	8/2
CM ₆	alumine	dichlorométhane	
CM ₇	"	benzène/dichlorométhane	1/1
CM ₈	"	benzène	

- Chromatographie sur papier.

P₁ : système de Zaffaroni (121, 122), ligroïne / propenediol pour séparer divers C₁₉O₂.

P₂ : système de Bush (123), isooctane/MeOH/H₂O, 10/9/1 pour séparer divers C₁₉O₂.

P₃ : système de Schneider et Lebwart (124), pour les sulfates.

- Chromatographie en phase gazeuse.

Les systèmes utilisés ont été décrits dans le chapitre portant sur les méthoximes.

4 - Modalités d'étude des stéroïdes conjugués.

1 - Dans la plupart des cas, les urines après extraction de la fraction libre, ont été traitées de façon à obtenir séparément et quantitativement les stéroïdes sulfo et glucuro-conjugués (125). Les urines ont été additionnées de 20 % de chlorure de sodium et acidifiées à pH 1 ; les stéroïdes conjugués ont été extraits 3 fois une heure par l'acétate d'éthyle (v/v) à l'aide d'un tapis roulant : l'acétate d'éthyle a été deshydraté par du sulfate de sodium anhydre car la présence d'eau diminue le rendement de la solvolysé, en 15 heures à 37°C la coupure des sulfo-conjugués est achevée et les glucuro-conjugués ne sont pas libérés (305). Ces derniers ont été extraits de la phase acétate d'éthyle par lavage à la soude 2N (2 x v/10) et de l'eau (1 x v/10) et l'hydrolyse enzymatique (48 h à 37°C) a été réalisée à pH 5 par le suc digestif d'*Helix Pomatia* L. (SHP). L'extraction des stéroïdes ainsi libérés a été faite par l'éther. Parfois nous avons opéré dans l'ordre inverse ; hydrolyse enzymatique par la β -glucuronidase (kétodase), libérant uniquement les glucuro-conjugués, puis solvolysé. Généralement les stéroïdes "sulfates" et glucuro-conjugués", ont été séparés en fractions cétonique et non cétonique par le réactif T de Girard, qui a la propriété de se condenser avec les cétones, en milieu acide, pour donner un composé hydrosoluble.

2 - Dans certaines expériences, dans le but de donner plus de certitude à la nature sulfate ou glucuronide de la conjugaison, nous avons utilisé un protocole décrit par Mac Kenna et Norymberski (126) pour isoler les sulfates de stéroïde ; il consiste à les convertir en sulfates de pyridinium et de stéroïde, qui deviennent extractibles par le chloroforme, alors que les glucuronides de stéroïde demeurent dans la phase aqueuse. Les glycuco-conjugués sont extraits par le tétrahydrofuranne (THF), puis hydrolysés par la kétodase.

Nous avons fait une étude de rendement de la technique d'extraction des sulfates par le sulfate de pyridinium et des glucuronides par le THF. A 50 ml d'urine, nous avons ajouté :

- 300 000 dpm de sulfate de 1,2 ^3H -épitestostérone
- 25 000 dpm de glucuronide de 4- ^{14}C -testostérone (préparé par le Dr. Robel).
- 5,5 ml de sulfate de pyridinium, 3M.

L'extraction du sulfate d'épitestostérone était de 96 %, celle du glucuronide de testostérone était de 92 %.

5 - Critères d'identification.

Ils ont varié suivant la nature et la quantité disponible du stéroïde. La dilution isotopique avec des composés de référence, recristallisés, a été utilisée dans certaines expériences : l'identité des activités spécifiques des cristaux lors de deux cristallisations successives, et de l'eau mère, a été considérée comme une preuve de la

2 - Dans certaines expériences, dans le but de donner plus de certitude à la nature sulfate ou glucuronide de la conjugaison, nous avons utilisé un protocole décrit par Mac Kenna et Norymberski (126) pour isoler les sulfates de stéroïde ; il consiste à les convertir en sulfates de pyridinium et de stéroïde, qui deviennent extractibles par le chloroforme, alors que les glucuronides de stéroïde demeurent dans la phase aqueuse. Les glycuco-conjugués sont extraits par le tétrahydrofuranne (THF), puis hydrolysés par la kétodase.

Nous avons fait une étude de rendement de la technique d'extraction des sulfates par le sulfate de pyridinium et des glucuronides par le THF. A 50 ml d'urine, nous avons ajouté :

- 300 000 dpm de sulfate de 1,2 ^3H -épitestostérone
- 25 000 dpm de glucuronide de 4- ^{14}C -testostérone (préparé par le Dr. Robel).
- 5,5 ml de sulfate de pyridinium, 3M.

L'extraction du sulfate d'épitestostérone était de 96 %, celle du glucuronide de testostérone était de 92 %.

5 - Critères d'identification.

Ils ont varié suivant la nature et la quantité disponible du stéroïde. La dilution isotopique avec des composés de référence, recristallisés, a été utilisée dans certaines expériences : l'identité des activités spécifiques des cristaux lors de deux cristallisations successives, et de l'eau mère, a été considérée comme une preuve de la

nature et de l'homogénéité radiochimique du composé. Ailleurs, nous avons formé un dérivé doublement marqué (acétate de stéroïde, benzhydrazone ou méthoxime de l'acétate de stéroïde) et le rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ devait être constant dans ce dérivé, lors de deux cristallisations successives. Devant l'impossibilité habituelle de disposer d'une quantité suffisante de matériel pour établir notamment le point de fusion et le spectre IR des métabolites radioactifs, nous avons vérifié la constance de l'activité spécifique ou celle du rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ dans différents dérivés. Ces critères joints au comportement chromatographique dans plusieurs systèmes ont été ceux que nous avons utilisés : dans l'étude de la formation d'acétate de testostérone in vitro et dans celle portant sur la structure d'un dérivé voisin des composés $\Delta 16$, nous avons pu déterminer le poids moléculaire par spectre de masse.

6 - Mesure de la radioactivité.

Les radioactivités ^3H et ^{14}C ont été mesurées simultanément sur un spectromètre à scintillation liquide, Packard modèle 3003, utilisé à tension constante.

Comptage des échantillons secs.

Ils ont été repris par 0,2 ml d'éthanol absolu et par 5 ml d'une solution scintillante de toluène contenant 0,3 % de diphenyl-oxazole (PPO) et 0,01 % de 1,4 bis [2-(5-phényl-oxazolyl)] -benzène, (POPOP). Les réglages des canaux ont été faits en établissant les spectres du

tritium et du ^{14}C , en recherchant les meilleures conditions de comptage par analyse statistique et en mesurant les coefficients de Loewringer :

	GAIN	Seuil inférieur	Seuil supérieur
^3H	60	10	80
^{14}C	10	28	100

Dans ces conditions le rendement de l'appareil (en l'absence de quenching) a été de 30 % pour le tritium (bruit de fond 11 à 15) et 43 % pour le ^{14}C (bruit de fond 6 à 8). Les comptages ont été faits de manière à obtenir une erreur ≤ 5 %, et les calculs réalisés selon Okita et al. (127).

Comptage du tritium dans des échantillons aqueux.

A l'échantillon aqueux (0,2 ml ou 0,5 ml), nous avons ajouté 5 ou 10 ml d'une solution scintillante contenant 7,5 g de 2-5 diphényl-oxazole (PPO), 0,125 g de 1,4 bis [2-(5phényl-oxazolyl)]-benzène (POPOP), et 120 g de naphthalène pour un litre de dioxane distillé, 0,5 litre de xylène et 0,3 litre d'éthanol à 9,5 %.

Mesure du tritium : les réglages sont les mêmes que précédemment. Le rendement de comptage était en moyenne de 27 % avec un bruit de fond de 30. Pour des échantillons d'urine, une correction du quenching a été faite après utilisation d'un standard interne.

B - Méthodologie particulière.

Nous distinguerons deux parties :

- Synthèse de divers stéroïdes radioactifs et non radioactifs.

- Mise au point d'une technique de microdosage de divers stéroïdes par double dilution isotopique.

1 - Synthèse de divers stéroïdes.

Les études métaboliques que nous avons entreprises ont rendu nécessaire la préparation de certains composés.

a - Biosynthèse de 4-¹⁴C-épitestostérone.

Nous avons mis au point un protocole de préparation basé sur la propriété particulière qu'ont les globules rouges de mouton de transformer la testostérone ou l'androstènedione en épitestostérone (128).

Le sang périphérique (100 ml) d'un mouton a été prélevé stérilement dans un bécher contenant de l'héparine, conservé à +4°C pendant le transport jusqu'au laboratoire

et incubé 3 h à 38°C en aérobie, après addition de 50 µc de 4-¹⁴C-androstènedione (AS - 45 mCi/mM). Après incubation, les globules rouges ont été lysés par deux volumes d'eau distillée. Après alcalinisation à pH 10 par NaOH 10 N, la solution a été extraite par l'acétate d'éthyle (3 x 3 vol.). La phase organique a été lavée par la soude 0,4N et par l'eau, puis évaporée à sec. L'épitestostérone a été purifiée dans différents systèmes chromatographiques, en couche mince (migration bidimensionnelle dans les systèmes CM₆ puis CM₂), sur papier dans le système P₂ (repérage de la radioactivité après scanning), par gradient d'élution sur colonne d'alumine (système A₁). Le rendement final de transformation en épitestostérone a été de 10 %.

Deux sortes de méthodes ont été utilisées pour identifier l'épitestostérone formée. Dans la première, nous avons ajouté à une portion aliquote de 4-¹⁴C-épitestostérone une quantité donnée de 1,2 ³H-épitestostérone dans un rapport convenable ; l'ensemble a été chromatographié dans les systèmes CM₆ et C₁ : le rapport ³H/¹⁴C était identique, dans chaque tube du pic de la colonne de chromatographie, à celui mesuré avant chromatographie.

Dans la deuxième méthode, nous avons ajouté à une autre portion aliquote de 4-¹⁴C épitestostérone, 15 mg d'épitestostérone non radioactive, deux cristallisations successives ont été réalisées dans le méthanol. Le rapport ³H/¹⁴C dans les cristaux et dans l'eau mère des deux cristallisations était à 2 % près le même que dans le produit

avant cristallisation. L'activité spécifique de ce produit a été établie après acétylation par l'anhydride acétique tritié (AS, 100 mCi/mM) et dans les conditions habituelles décrites plus loin : elle était de 51 mCi/mM.

b - Sulfates de stéroïde.

Nous avons préparé, selon le procédé de R. Emiliozzi (129) différents sulfates de stéroïde :

ST et S-EpiT non radioactifs,

S-³H-T (AS, 36 Ci/mM) - S-4 ¹⁴C-T (AS, 51 mCi/mM)

S-³H-EpiT (AS, 24,5 Ci/mM) - S-4 ¹⁴C-EpiT (AS, 51 mCi/mM)

Au stéroïde évaporé à sec, nous avons ajouté 5 mg du complexe pyridinium (anhydride sulfurique, pyridine, fourni par R. Emiliozzi), et le mélange réactionnel a été laissé en contact 48 h à 25°C. Après addition de 2 ml de NH₄OH et évaporation à sec, l'extrait a été chromatographié sur colonne de célite successivement dans les systèmes C₆ et C₇. Le produit ainsi purifié avait après solvolysé, le même comportement chromatographique que le stéroïde libre de référence. Les sulfates de testostérone et d'épitéstostérone non radioactifs ont été recristallisés dans le méthanol : le point de fusion de ST était de 218-221°C, celui de S-EpiT était de 151-153°C. Les spectres IR de ST et de S-EpiT ont montré les deux bandes sulfates à 1240 et 1070 cm⁻¹ et la Δ4-3-cétone à 1610 et 1675 cm⁻¹ (Fig. 17).

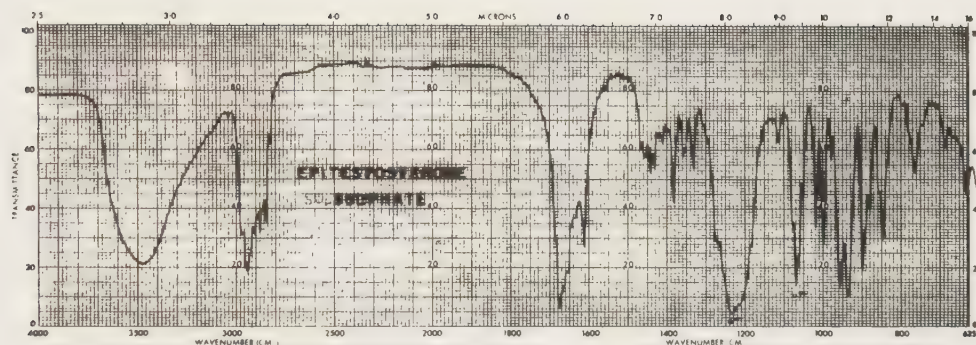


Fig. 17

Spectre infrarouge dans KBr du sulfate d'épitestostérone préparé selon le protocole de la page 77.

Dans le cas des sulfates de stéroïde radioactif, l'identification est achevée, après addition du sulfate de stéroïde correspondant non radioactif, par la preuve de la constance de l'activité spécifique des cristaux au cours de 3 cristallisations successives.

c - Préparation du 5 β -androstane-3 α ,17 α -diol : selon Gabbard et al. (130).

A 300 mg d'épitestostérone, nous avons ajouté 10 ml d'EtOH absolu, 30 mg de palladium à 10 % de charbon, 8 mg KOH dans 1 ml H₂O. La réduction faite sous 2 atm. H₂ est stoppée au bout de 2 h. Le mélange réactionnel a été filtré, neutralisé. Après addition de 25 ml d'H₂O, l'extraction a été faite par 3 x 100 ml CH₂ Cl₂. L'extract a été lavé avec de l'eau, séché avec du sulfate de soude anhydre et évaporé sous vide à 40°C. Une fraction aliquote du produit chromatographiée sur couche mince dans le système CM₂ n'a pas montré d'épitestostérone détectable par absorption de la lumière ultraviolette. Après révélation par le réactif de Zimmermann, nous avons observé l'existence de 2 spots migrant plus vite que l'épitestostérone et n'absorbant pas l'UV : une fraction aliquote de chaque spot a été oxydée par l'acide chromique et le dérivé obtenu provenant du stéroïde le plus polaire, migrait dans le système CM₂ comme le 5 β -androstane-3,17-dione de référence ; le produit de réduction le moins polaire correspondait, après oxydation chromique et chromatographie dans le même système, au 5 α -androstane-3,17-dione de référence : le rapport des deux isomères 5 β /5 α était environ de 4. Après séparation à l'aide de grandes plaques préparatives 20 x 45 cm dans le système CM₂

(durée de migration 4 h), 20 mg de 5 β -androstén-17 α -ol-3-one ont été cristallisés dans le méthanol, puis réduits par le borohydrure de potassium. En traitant le produit obtenu par la digitonine, aucun précipité visible n'a été formé, suggérant que la 5 β -3-cétone a été essentiellement réduite en composé 3 α OH. Après chromatographie par gradient sur colonne d'alumine dans le système A₂, il n'existait qu'un seul pic, cristallisé dans le méthanol. Le point de fusion était de 222°C, conforme à celui trouvé dans la littérature. Le R_f en couche mince dans le système CM₂ était de 0,49 (l'épi-testostérone servant de référence). Le temps de rétention en chromatographie en phase gazeuse sur SE 30 à 200°C était de 0,35 (le cholestane servant de référence). Le spectre de résonance nucléaire magnétique (RNM) était compatible avec la structure du 5 β -androstène-3 α ,17 α -diol (Fig. 18).

d - Préparation du 16-androstén-3 α -ol.

La tosylhydrazone (P. toluène sulfonyl-hydrazone) de l'acétate d'androstérone a été formée suivant la technique de Gaglioti et al. (131), la tosylhydrazine ayant été préalablement obtenue cristallisée, selon le protocole de Friedman (132). La formation du dérivé Δ 16 a été obtenue par traitement de la tosylhydrazone (500 mg) avec LiAl H₄ (750 mg) dans 15 ml de tétrahydrofuranne. Après ébullition à reflux à 65°C pendant une nuit, l'excès d'hydrure a été éliminé après addition lente d'un mélange éther/eau (v/v). La solution étherée a été lavée avec SO₄H₂ (v/10) et de l'eau (2 x v/10), nous avons obtenu après cristallisation dans le méthanol, 100 mg d'un produit dont l'odeur est caractéristique. Les critères d'identification ont été apportés par le point de fusion 143-146°C, le spectre de masse (Fig. 19) et le spectre infrarouge (Fig. 20).

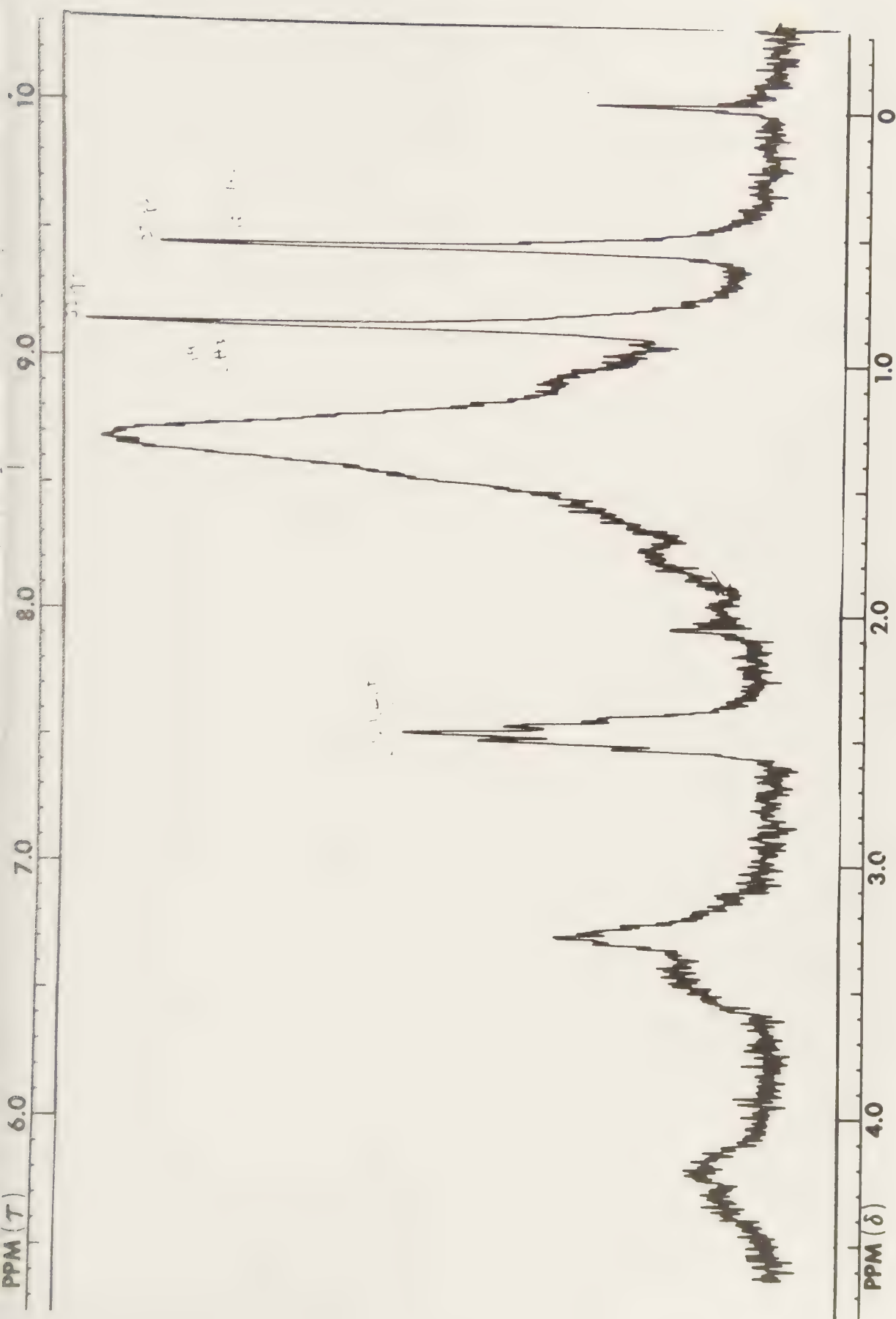
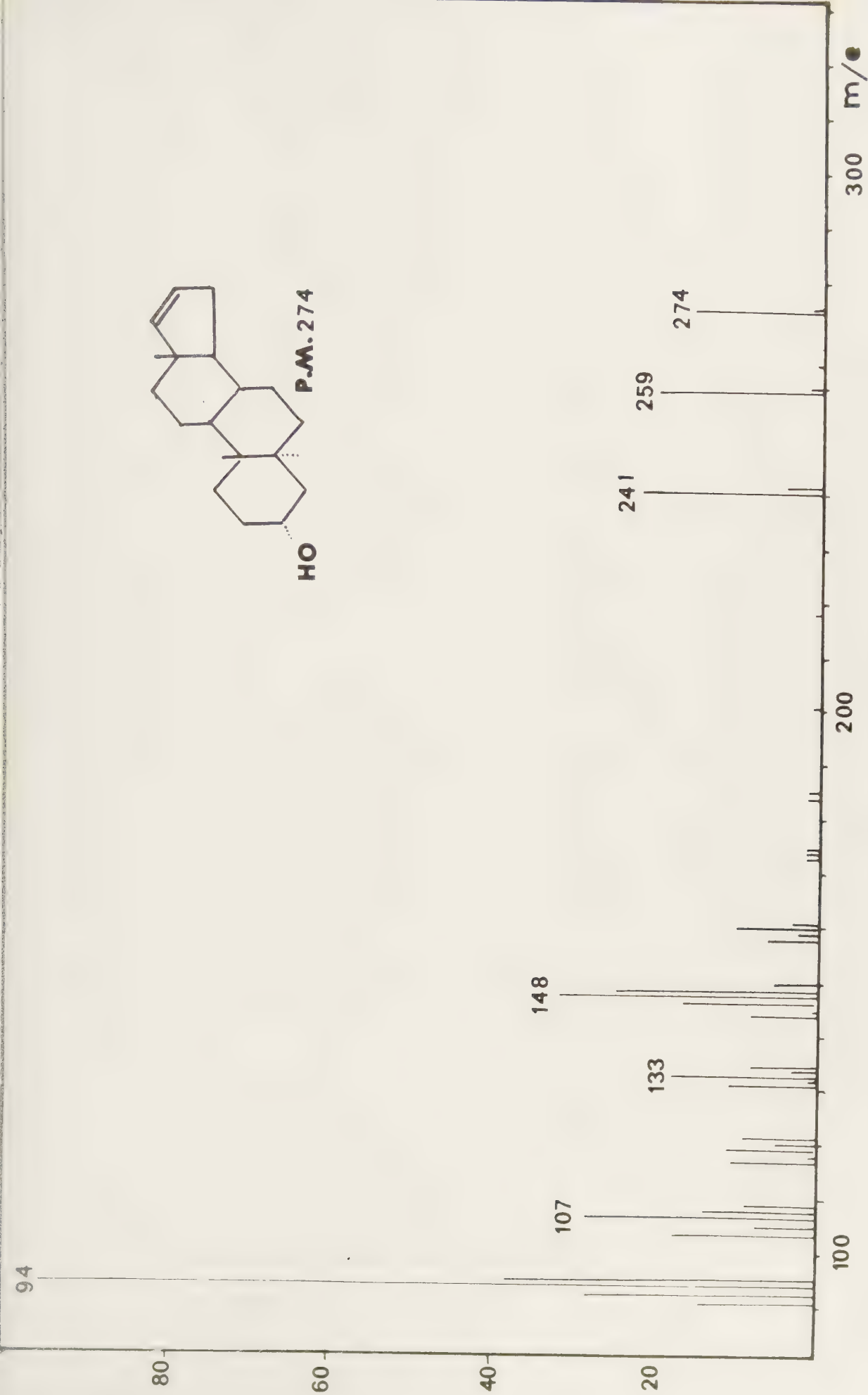


Fig. 18

Spectre de résonance nucléaire magnétique (RMN) du 5 β -androstane-3 α ,17 α -diol, préparé selon le protocole de la page 79.



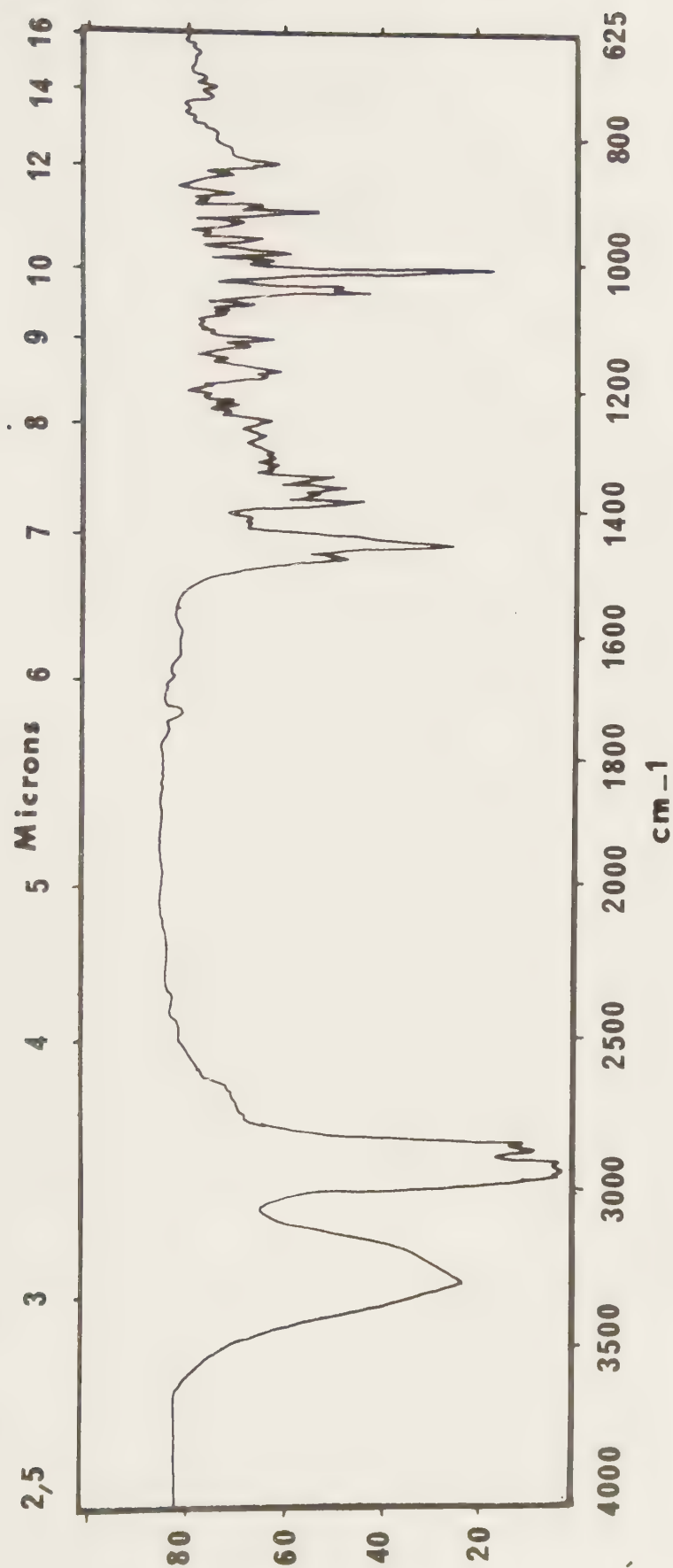


Fig. 20
Spectre infrarouge dans KBr du 16-endrostén-3 α -ol,
préparé selon le protocole de la page 80.

2 - Dosages par double dilution isotopique.

a - Introduction.

Les stéroïdes suivants : testostérone et épitestostérone (libres et sulfates) plasmatiques, testostérone (glucuronide) et épitestostérone (sulfate et glucuronide) urinaires, ont été mesurés par double dilution isotopique.

La méthode a été mise au point pour la testostérone plasmatique ; nous la décrivons ici et soulignerons plus loin les adaptations faites pour les autres composés.

Ce n'est qu'en 1961 que Finkelstein et al. (133) ont publié la première méthode valable de dosage de la testostérone plasmatique : une fois isolée, la testostérone est convertie en oestrone par une préparation de microsomes placentaires et l'oestrone est mesurée par une méthode fluorimétrique : cette méthode est peu sensible car elle nécessite 50 ml de plasma d'un homme adulte. En dehors de ses auteurs (134), elle a été peu utilisée. Par contre, deux autres méthodes d'approche se sont développées simultanément et se sont également imposées :

- d'une part celle basée sur le principe d'une double dilution isotopique, le standard interne (testostérone) étant tritié ou marqué avec du ^{14}C , alors que le réactif peut être marqué avec du ^{35}S comme la thiosemicarbazide (135), du ^{14}C ou du tritium comme avec l'anhydride acétique (136, 137, 138).

- D'autre part, celle utilisant la chromatographie en phase gazeuse de dérivés de la testostérone, notamment du chloro-acétate et détection par capture d'électrons (139).

Ces deux méthodes ont leurs adeptes : la chromatographie en phase gazeuse permet de mesurer des quantités de l'ordre du nanogramme mais au prix d'un protocole très délicat. La technique que nous avons mise au point utilise l'anhydride acétique radioactif comme indicateur interne. Le rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ est mesuré au niveau des deux isomères du 3-méthoxime de l'acétate de testostérone.

b - Etude des différentes étapes.

α - Testostérone plasmatique chez l'homme adulte.

- Extraction et purification : le plasma (10 ml) est extrait par l'éther (2 x 2v) après addition de 1660 dpm (5 ng) de 4- ^{14}C -T et 0,6 ml de NaOH, 3N. L'extrait sec est chromatographié sur colonne de célite dans le système C_1 après addition de déhydroépiandrosterone tritiée ou mieux de 5β-androsterone tritiée. On recueille les deux volumes de rétention qui suivent la radioactivité tritiée : ils contiennent notamment la testostérone et l'épitestostérone (Fig. 21).

- Acétylation : par l'anhydride acétique tritié, 20 µl (activité spécifique 100 mCi/mM) dans la pyridine (10 µl). Après 15 h à 25°C, on ajoute 1 ml d'éthanol à 20 %, 50 µg d'acétate de testostérone et 50 µg d'acétate d'épitestostérone. Après extraction par le dichlorométhane (2 x 10 ml), et lavage avec de l'eau (2 x 2 ml) l'extrait est évaporé à sec.

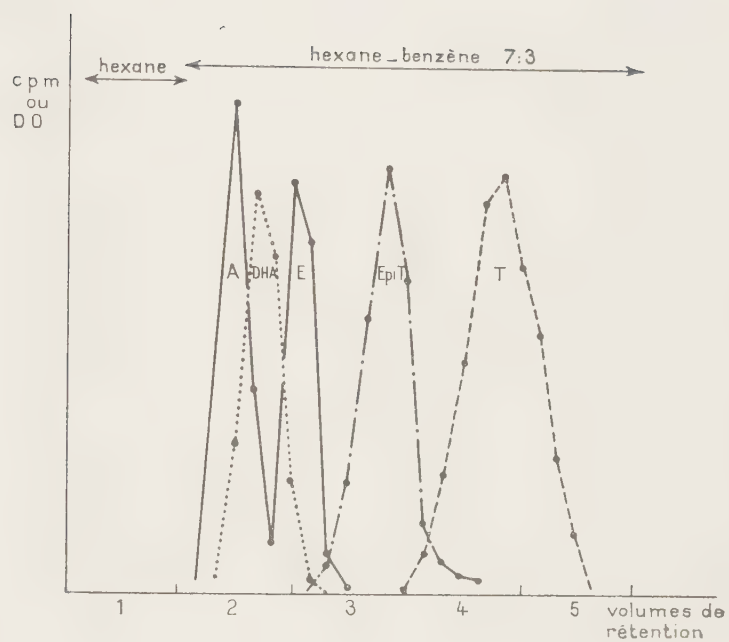


Fig. 21

Chromatographie sur colonne de célite
dans le système C_1 (voir page 68)

- Purification de l'acétate de testostérone : réalisée après chromatographies en couche mince dans le système CM₆, une bi et une monodimensionnelles : les acétates de T et d'EpiT ont un Rf nettement distinct (tableau XIII).

- Formation de dérivés : au début de la mise au point de cette technique, 3/5èmes de l'extrait contenant l'acétate de T réagissaient avec 1 ml de phénylhydrazine à 1 % dans l'éthanol et 0,2 ml d'acide acétique glacial, la réaction était achevée après 24 h à 25°C ou 1 h à 60°C. La phénylhydrazone était purifiée sur colonne de célite dans le système C₂ (3ème VR de la phase hexane, benzène 3/7) et le rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ était mesuré dans l'acétate de T et dans la phénylhydrazone de l'acétate de T. La possibilité particulière de la fonction 3-cétone de former deux isomères méthoximes, nous a incité à utiliser ces dérivés à la place du dérivé phénylhydrazone. A l'extrait sec contenant l'acétate de T, nous ajoutons 0,1 ml de chlorhydrate de O.méthylhydroxylamine à 1 % dans la pyridine : la réaction est totale en 2 h à 37°C (le réactif est stable dans la pyridine pendant plusieurs semaines). Après addition de 0,5 ml d'eau distillée et extraction par 2 x 5 ml de dichlorométhane, l'extrait sec est chromatographié en couche mince dans le système CM₇. La séparation peut être réalisée en chromatographie gazeuse sur XE 60 à 2 % (Fig. 22).

TABLEAU XIII

Chromatographies en couche mince, et dans différents systèmes de l'acétate de testostérone (AT), des méthoximes (a et b) de AT, de l'acétate d'EpiT (A-EpiT) et des méthoximes (a et b) de A-EpiT.

Stéroïdes.	Alumine GF 254		Silicagel GF 254
	Rf		Rf
	CM ₆	CM ₇	CM ₂
AT	0,76		0,34
AT (MO)a		0,57	0,86
AT (MO)b		0,45	0,82
A-EpiT	0,87		0,32
A-EpiT (MO)a		0,68	0,85
A-EpiT (MO)b		0,51	0,81

CM₂ : Benzène/Acétate d'éthyle, 3/2

CM₆ : Dichlorométhane

CM₇ : Benzène/Dichlorométhane, 1/1

(MO)a: Isomère le moins polaire

(MO)b: Isomère le plus polaire.

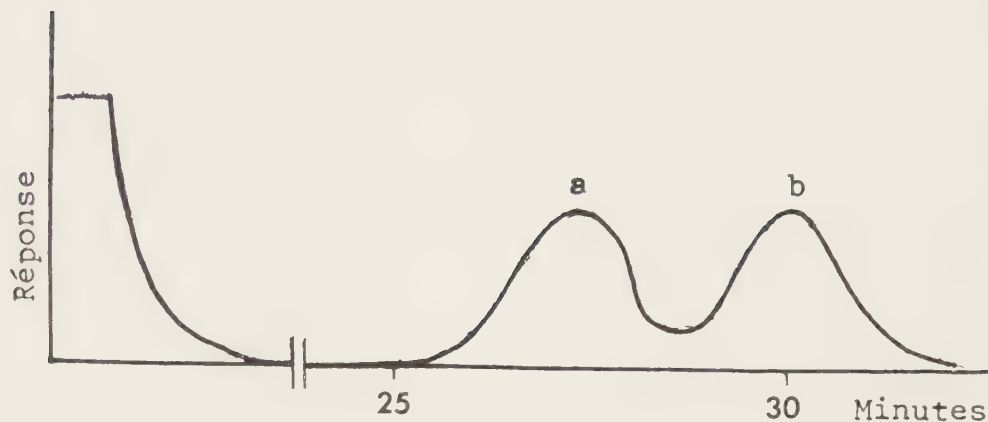


Fig. 22

Pics obtenus après chromatographie en phase gazeuse
du 3-MO de l'acétate de testostérone. XE 60 2 %,
température 192°, 80-100 mesh. 10p.si.
Temps de rétention relatif (TRR) à celui de l'acétate
de testostérone :

- isomère a, TRR : 0,59
- isomère b, TRR : 0,63

- Mesure de la radioactivité et calculs : chaque isomère est évaporé à sec dans une fiole de comptage. Après addition de 0,2 ml d'éthanol et 5 ml de liquide scintillant normal, la radioactivité est mesurée : 10 000 cpm sont totalisés pour obtenir une erreur $< 5 \%$. Le calcul de la concentration est donné par la formule :

$$\left[\frac{R}{AS \text{ } ^3H} \times \frac{^3H}{^{14}C} \times \frac{PM_1}{PM_2} - p \right] \times \frac{100}{V}$$

R : cpm de 4- ^{14}C -T ajoutés au plasma
 AS ^3H : activité spécifique de l'acétate de cortisol
 $^3H/^{14}C$: valeur moyenne obtenue à partir des isomères MO
 PM₁ : poids moléculaire de T
 PM₂ : poids moléculaire de l'acétate de F
 p : poids de ^{14}C -T ajoutée
 V : volume de l'échantillon plasmatique.

- Critères de validité de cette technique :

- **Précision** : le tableau XIV montre un coefficient de variation (écart-type/moyenne) de 6,8 % pour 5 déterminations faites sur un échantillon de plasma d'homme normal.

- **Rendement** : il est au total de 25 à 30 %

- **Sensibilité** : à 5 échantillons de 10 ml du pool plasmatique précédent, on a ajouté 5 ng de testostérone et 10 ng de testostérone à 4 autres échantillons. Le coefficient de variation est de 6,8 % dans chaque lot (tableau XIV).

TABLEAU XIV

Précision et sensibilité du dosage de la testostérone plasmatique (T) chez l'homme adulte, par double dilution isotopique : valeurs exprimées en ng/10 ml de plasma. Le même lot de plasma a servi pour les 3 expériences :

A - sans addition de T

B - après addition de 5 ng de T

C - après addition de 10 ng de T

	Expériences		
	A	B	C
Nombre de mesures	(5)	(5)	(4)
Valeurs obtenues	51,6	59,3	65,5
	56,2	59,4	66,3
	57,3	62,2	67,1
	61,7	62,4	73,6
	62,5	66,9	-
Moyenne	57,4	62,2	68,1
$\pm$ DS	0,049	0,050	0,060
Coefficient de variation (écart type/moyenne)	6,8 %	6,8 %	6,8 %

- "Témoin" non spécifique : pour chaque série de dosages, nous introduisons un témoin aqueux : la même quantité de 4- ^{14}C -T est ajoutée à un volume aqueux correspondant exactement au volume plasmatique. A la valeur trouvée, nous déduisons la valeur réelle du poids de 4- ^{14}C -T ajoutée. On obtient une valeur résiduelle qui représente le "témoin" du dosage. Il ne dépend ni du volume aqueux, ni des volumes des solvants. Il est par contre, influencé par le rendement global de la technique, augmentant si le rendement est faible. Il dépend enfin de la qualité de l'anhydride acétique : l'utilisation d'un lot d'anhydride acétique distillé la veille de l'acétylation diminue la valeur du "témoin" d'environ 90 % (tableau XV).

- Spécificité :

- Le comportement chromatographique de la testostérone et de ses dérivés (acétate et méthoximes d'acétate) dans différents systèmes est déjà un critère important.

- Le rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ identique dans les deux isomères du méthoxime est un critère supplémentaire que nous avons introduit. Supposons que l'un des isomères soit mal séparé d'un quelconque stéroïde acétylable : dans ce cas, le rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ sera plus élevé que dans l'autre isomère. le tableau XVI montre la bonne concordance des valeurs de la testostérone plasmatique calculées à partir des deux méthoximes et de l'acétate de testostérone après cristallisations successives.

TABLEAU XV

Valeurs du "blanc" en fonction du volume aqueux et de la quantité de ^{14}C -testostérone ajoutée : l'anhydride acétique tritié a été distillé la veille de l'acétylation.

Volume aqueux (ml)	4 ^{14}C -T (ng)	Valeur trouvée (ng)	"Blanc" (ng)
20	5,00	5,50	0,50
20	2,50	3,46	0,96
20	2,50	3,38	0,88
20	2,50	3,50	1,00
10	5,00	5,20	0,20
10	5,00	5,20	0,20
10	2,50	3,60	1,10

TABEAU XVI

Rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ dans l'acétate de testostérone avant et au cours de 3 cristallisations successives après addition de 20 mg d'acétate de testostérone, et valeurs comparées de la testostérone plasmatique en $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, calculées à partir de l'acétate et à partir des méthoximes chez 2 hommes hyperthyroïdiens.

Cas	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ dans l'acétate de testostérone						Testostérone plasmatique	
	Avant	Cristallisations					Méthoximes	Acétate de T.
	Crist.	1 ^è		2 ^è		3 ^è		
		<u>e.m</u>	<u>cx</u>	<u>e.m</u>	<u>cx</u>	<u>cx</u>		
1	5,80	6,75	6,90	6,70	6,80	6,65	1,84	1,78
2	10,01	11,40	11,35	11,70	11,70	-	2,16	2,06

e.m : Eaux mères

cx : cristaux.

β - Testostérone chez la femme.

Chez la femme, l'enfant et les insuffisances gonadiques masculines, le volume plasmatique utilisé est de 20 ml et la quantité radioactive de la testostérone ajoutée est de 830 dpm. La limite de sensibilité est de 10 ng de testostérone pour 100 ml de plasma.

3 - Testostérone plasmatique et radiocompétition.

Murphy (140) a développé une méthode de dosage par radiocompétition pour les stéroïdes ayant une forte affinité de liaison protéique. Nous avons essayé une technique utilisée par Knobil (141) basée sur ce principe. Trois pools de plasma ont été utilisés pour cette étude : le coefficient de variation obtenu était 11,6 - 20 - 22,4 %, donc nettement supérieur à celui de la double dilution isotopique (tableau XVII). La pureté des solvants, la nature du support chromatographique, la propreté de la verrerie sont des facteurs intervenant dans la valeur du "témoin", expliquant notamment sa grande variabilité. Il est cependant incontestable que si ces difficultés peuvent être résolues d'une manière permanente, la méthode par radiocompétition doit ouvrir un champ d'investigation plus vaste par la rapidité du dosage, sa simplicité et le volume faible de plasma exigé : 0,2 ml pour l'homme et 1 ml pour la femme.

TABLEAU XVII

Détermination de la testostérone plasmatique en $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ par radiocompétition. Etude de la reproductibilité à partir de différents pools plasmatiques.

	I	II	III
1	0,062	0,71	0,48
2	0,060	0,63	0,60
3	0,042	0,46	0,56
4	0,044	0,73	0,76
5	0,039	0,58	0,43
6	0,069	0,62	0,44
7	0,041	0,69	0,60
8	0,040	0,69	0,48
9	-	0,67	
10	-	0,66	
Moyenne	0,049	0,64	0,54
$\pm 1\text{ DS}$	0,009	0,05	0,09
Coefficient de variations (Ecart type/moyenne)	22,4 %	11,6 %	20 %

C - Problèmes méthodologiques : artefact de formation d'acétates de stéroïde.

1 - Critères d'identification de l'acétate d'EpiT.

Dans certaines expériences métaboliques, après administration d'EpiT tritiée, nous avons remarqué l'existence d'un métabolite de faible polarité, moins polaire que l'androstènedione en chromatographie de partage dans les systèmes C_1 et C_2 . Après extraction de la fraction libre, solvolyse, hydrolyse enzymatique par le suc d'*Helix Pomatia* et purification par le réactif T de Girard, nous avons retrouvé ce composé dans la fraction cétonique de l'hydrolysat enzymatique. Le pourcentage de transformation variait de 0,4 à 1,4 %. Certes, nous avons accumulé différentes informations sur la nature du composé formé :

- pas de fonction alcool acétylable,
- une fonction cétone conjuguée, présentant un $\lambda_{\max}$ à 240 m μ ,
- existence de 2 dérivés méthoximes au maximum, faisant supposer qu'il s'agissait d'une Δ^4 -3-cétone,
- faible polarité en chromatographie de partage.

En fait, la connaissance ultérieure du poids moléculaire 330, par spectrométrie de masse (Fig. 23) nous a conduit à apporter la preuve qu'il s'agissait de l'acétate d'EpiT par l'étude de la fragmentation de la molécule par spectrométrie de masse, et par la constance des activités spécifiques au cours de cristallisations répétées, après addition de 20 mg d'acétate d'EpiT non radioactif.

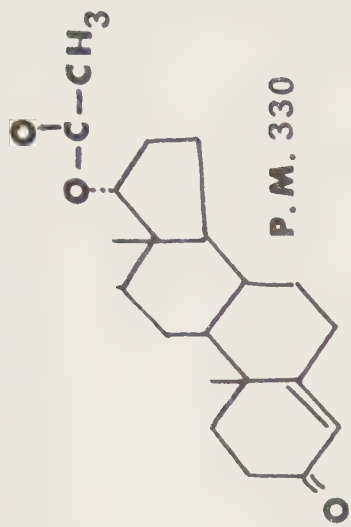
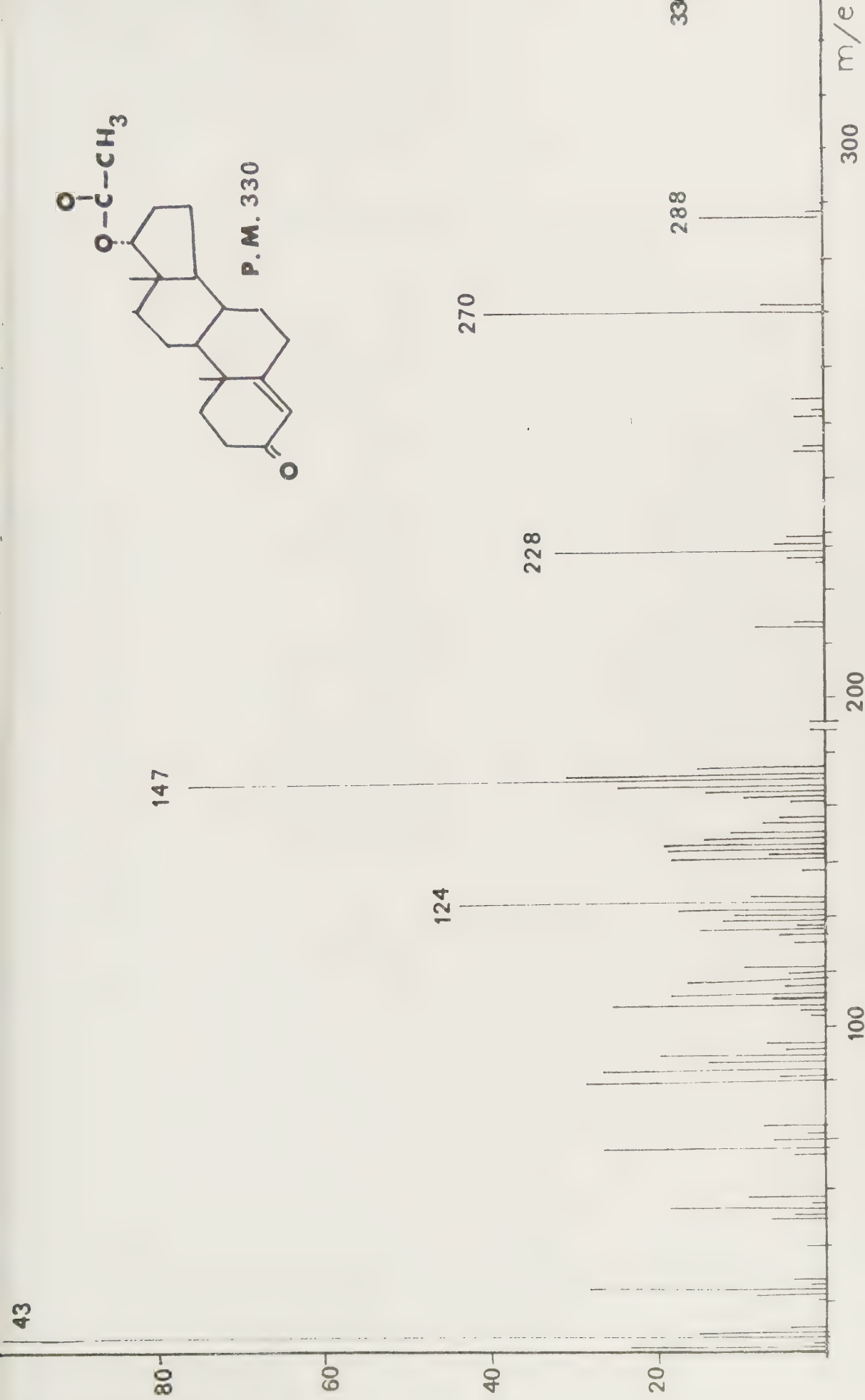


Fig. 23

Spectre de masse de l'acétate d'épitestostérone

2 - Formation in vitro de l'acétate d'EpiT.

L'existence d'acétate d'EpiT, isolée dans les conditions décrites, soulevait l'hypothèse d'une transformation in vivo de l'EpiT tritiée en glucuronide (3-énol) de l'acétate d'EpiT. Cette hypothèse était renforcée par la constatation de l'acétylation in vivo de certains C₂₁ stéroïdes, 11 déhydro-corticostérone (306) cortisol (307) et par l'existence supposée de métabolites urinaires : glucosiduronates d'énol-stéroïdes (308).

En réalité, il ne s'agissait pas d'un métabolite de l'EpiT. En effet, l'addition d'EpiT tritiée à une urine a permis de montrer qu'il s'agissait d'une transformation in vitro sous l'effet de l'hydrolyse enzymatique par le suc d'*Helix Pomatia* L, dans le tampon acétate : cette transformation ne s'observe plus si le tampon acétate est remplacé par du tampon phosphate, si l'enzyme est de la β -glucuronidase (kétodase) dans le tampon acétate.

Une transformation de même importance a été obtenue à partir de la testostérone ou de la déhydroépiandrostérone. Les mêmes critères d'identification ont été apportés, sauf ceux fournis par l'étude par spectrométrie de masse.

CHAPITRE IV

TESTOSTERONE ET EPITESTOSTERONE (FORMES LIBRES ET SULFATES) : RESULTATS DES ETUDES METABOLIQUES

A - ETUDES METABOLIQUES APRES ADMINISTRATION DE STEROIDES RADIOACTIFS

1 - Métabolisme comparatif de la testostérone et de l'épitéstostérone.

L'épitéstostérone (EpiT) a été identifiée dans le plasma de certains ruminants par Lindner (128, 142, 143) et dans l'urine humaine sous forme de glucuronide par Korenman et al. (144, 145), par Brooks (146), Schubert et al. (147) et par d'autres auteurs (148, 149). Le site de production reste imprécis : foie et rein de Lapin (150, 151) foie de Cobaye (152), foie de Chien (153), ovaire de Jument grévise (154), et ovaire sclérokystique humain (155).

Le problème du ou des précurseurs immédiats de l'EpiT n'est pas résolu. Lindner (156) dans une étude

importante sur la 17α -hydroxy-stéroïde deshydrogénase, présente dans les globules rouges du sang du Mouton et de la Vache, a montré que l'androstènedione est le précurseur de l'EpiT trouvée dans le sang de la veine spermatique de ces animaux ; il n'a pu détecter l'épitestostérone dans le tissu testiculaire, concluant que l'EpiT est un métabolite périphérique.

C'est dans ce contexte, que nous avons entrepris une étude du métabolisme de l'EpiT chez l'homme (157, 158).

a - Bilan radioactif de l'urine et de différentes fractions urinaires.

Protocole d'étude.

Les sujets choisis étaient des hommes adultes jeunes en bonne santé apparente. Le tableau ci-dessous indique le protocole d'étude dans chaque cas : doses radioactives administrées et durée du recueil des urines.

Exp.	Age	1,2 ^3H -EpiT x 10^6 cpm	4- ^{14}C -T x 10^6 cpm	Urines
1 HAMI.	20	20	2	4 jours
2 FEDJ.	28	54	2	3 jours
3 FERR.	25	20	2	2 jours
4 SZDO.	22	45	-	3 jours
5 BELK.	25	15	-	3 jours

L'analyse a été faite dès la fin du recueil des urines, sur la totalité de chaque diurèse de 24 h dans l'expérience HAMI., et sur la totalité des urines de 48 h dans les autres cas : extraction des stéroïdes libres par l'acétate d'éthyle fraîchement distillé, solvolysé des sulfo-conjugués, hydrolyse enzymatique des glycuco-conjugués par le suc d'*Helix Pomatia*, séparation des fractions cétonique et non cétonique par le réactif T de Girard. La radioactivité a été mesurée après prélèvement d'une portion aliquote de chaque fraction.

Résultats.

- Radioactivité totale urinaire : elle a été mesurée au cours de chaque expérience et trouvée plus faible en tritium qu'en ^{14}C (74,6 % en tritium contre 91,4 % en ^{14}C dans l'expérience HAMI.), alors que le pourcentage de radioactivité éliminée le premier jour était plus fort en tritium, 88 % contre 84 % en ^{14}C (Fig. 24).

- Radioactivité dans les différentes fractions urinaires : dans l'expérience HAMI. (tableau XVIII) les radioactivités ^3H et ^{14}C ont été mesurées dans différentes fractions obtenues selon le protocole décrit et à partir de chaque diurèse. La radioactivité trouvée dans le "résidu HCl" est également indiquée : la phase urinaire, après extraction à pH 1 par l'acétate d'éthyle est hydrolysée par HCl (5 %) à l'ébullition à reflux (30 mn) ; l'hydrolysât est ensuite extrait par 2 volumes d'éther, une fraction aliquote est évaporée à sec et la radioactivité mesurée.

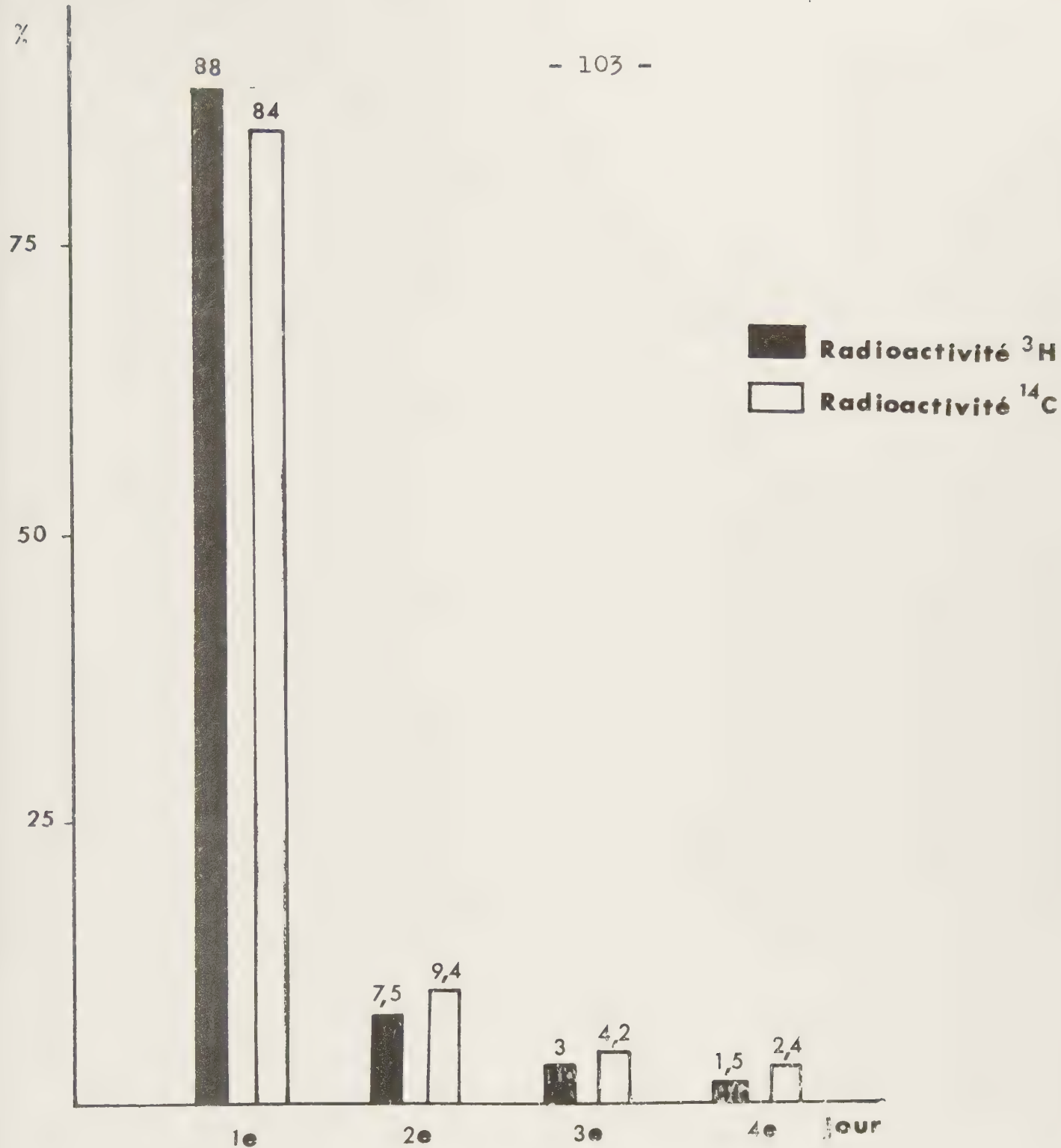


Fig. 24

Expérience HAMI. : Radioactivité urinaire (^3H et ^{14}C) quotidienne, évaluée en % de ^3H -Epil et ^{14}C -T administrées par voie intraveineuse.

TABLEAU XVIII

Expérience HAMI... Pourcentage des radioactivités ^3H et ^{14}C retrouvées après injection simultanée de 1,2- ^3H épitestostérone et de 4- ^{14}C -testostérone.

	1er jour		2è jour		3è jour		4è jour		total	
	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C
<u>Fraction libre.</u>	0,45	0,22	0,07	0,07	-	-	-	-	0,52	0,29
<u>Fraction sulfate.</u>										
Cétonique..	2,30	4,75	0,23	1,40	0,02	0,26	0,006	0,13	2,56	6,54
Alcoolique.	1,00	3,00	0,13	0,08	0,03	0,02	0,01	0,01	1,17	3,11
<u>Fraction glucuronide.</u>										
Cétonique..	21,30	35,00	0,36	1,00	0,05	0,23	0,01	0,18	21,72	36,41
Alcoolique.	6,65	3,00	1,90	0,30	0,57	0,10	0,30	0,09	9,42	3,50
<u>"Résidu HCl"</u>	1,20	2,20	0,13	0,58	0,08	0,10	-	-	1,38	2,88
Total...	32,90	48,17	2,82	3,45	0,75	0,71	0,33	0,41	36,77	52,73

Dans les 4 autres expériences, l'étude a été faite sur la totalité des urines de 24 h (tableau XIX). Le pourcentage de la radioactivité retrouvée en 48 h dans les différentes fractions analysées est plus faible en tritium (moyenne des 5 cas, 37 %) qu'en ^{14}C (moyenne des 3 cas, 48 %). D'autre part, l'élimination tritiée est plus rapide que celle du ^{14}C , sauf pour les glucuronides alcooliques (70 % le premier jour et 20 % le deuxième jour en tritium, contre 85 % et 8 % en ^{14}C).

Le métabolisme urinaire de l'épitestostérone est donc moins important que celui de la testostérone et il est plus rapide, sauf pour les glucuronides alcooliques.

b - Etude de la fraction libre.

L'un des problèmes importants que nous voulions résoudre dans nos expériences métaboliques était celui de la transformation possible de l'épitestostérone en testostérone et réciproquement. D'autre part, si cette transformation existe, doit-elle nécessairement passer par l'androstènedione ? Ce problème sera envisagé au niveau de chaque fraction étudiée (libre, sulfate et glucuronide).

Nous avons délibérément évité l'administration de doses pharmacodynamiques, nous limitant volontairement à des doses traceuses qui, ne modifiant pas le profil métabolique de l'hormone endogène, ont une plus grande chance d'en subir le même sort : l'hypothèse préalable était que l'hormone sécrétée et l'hormone injectée se répartissent dans les mêmes compartiments.

TABLEAU XIX

Bilan de la radioactivité (en %) de la dose administrée dans les différentes fractions urinaires après injection intraveineuse de ^{14}C -T et/ou ^3H /EpiT.

% de la dose injectée.	HAM.I.		FERR.		FEDJ.		SZDQ.	BELK.	Moyenne.	
	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H	^3H	^3H	^{14}C (5 cas)(3 cas)
<u>Fraction Libre</u>	0,52	0,29	0,70	0,40	0,52	0,15	0,44	0,90	0,51	0,28
<u>Fraction Sulfate</u>										
- Cétonique	2,53	6,15	2,10	4,00	2,60	2,00	5,80	2,00	3,00	4,05
- Alcoolique	1,13	3,08	3,11	1,20	0,96	-	0,82	0,80	1,36	1,42
<u>Fraction Glucuronide</u>										
- Cétonique	21,66	36,00	25,00	32,00	30,50	36,00	23,20	21,70	24,40	34,70
- Alcoolique	8,55	3,30	8,50	9,00	7,33	10,50	7,40	6,20	7,50	7,60
<u>Total</u>	34,39	48,82	39,41	46,60	41,91	48,65	37,66	31,60	36,77	48,05

Dans la fraction libre, T, EpiT et Δ ont été analysées après injection intraveineuse du ou des stéroïde(s) radioactif(s). La totalité des urines du premier jour a été extraite par le chloroforme (3 x v/3) après addition de 200 μ g de chaque stéroïde à identifier. L'extrait sec a été chromatographié successivement dans les systèmes C_2 et CM_6 . Le pourcentage de transformation a été apprécié, compte tenu du rendement, après la dernière chromatographie. L'identité des métabolites a été vérifiée par l'étude des activités spécifiques au cours de cristallisations successives, après addition de 20 mg du stéroïde testé. Le tableau XX montre les résultats obtenus dans trois expériences : dans la première (exp. SIMC.), ^3H -T et ^{14}C - Δ ont été administrées par voie intraveineuse, dans la seconde (exp. FEDJ.) c'est l'épitestostérone tritiée qui a été injectée et dans la troisième (exp. DRA.) la testostérone tritiée. Dans cette dernière expérience, la totalité de la radioactivité mesurée dans la région de l'épitestostérone après la 2ème chromatographie en couche mince (CM_6), était de 50 cpm, compte tenu du rendement 70 % : nous n'avons aucun argument pour affirmer qu'il s'agissait réellement d'épitestostérone tritiée. S'il y a eu transformation de la testostérone en épitestostérone elle devait être $\leq 0,0001$ %.

c - Etude des métabolites conjugués urinaires après injection endoveineuse de 1,2 ^3H -EpiT et de 4- ^{14}C -T.

Cette étude a comporté 6 expériences dont les

4 premières sont celles du chapitre A (p. 101)

- HAMI	$^3\text{H-EpiT}$ (20) + $^{14}\text{C-T}$ (2)
- FEDJ	$^3\text{H-EpiT}$ (54) + $^{14}\text{C-T}$ (2)
- FERR	$^3\text{H-EpiT}$ (20) + $^{14}\text{C-T}$ (2)
- TOUA	$^3\text{H-EpiT}$ (20)
- BELK	$^3\text{H-EpiT}$ (15)
- DIAM	$^3\text{H-EpiT}$ (20)

Les valeurs entre parenthèse ($\times 10^6$ cpm) représentent la radioactivité injectée.

α - Métabolites cétoniques.

Méthodologie générale

Identification de l'androstérone (A) et du 5β -androstérone (5β -A): la fraction cétonique (sulfate ou glucuronide) obtenue après purification par le réactif T de Girard a été chromatographiée sur colonne de célite dans le système C_1 qui assure une très bonne séparation entre A et 5β -A. L'éluat de colonne correspondant à chaque stéroïde a été évaporé à sec et chromatographié sur papier dans le système P_1 après addition de 50 μg de A et de 5β -A. Après une migration de 15 h à 25°C , une bandelette médiane a été révélée par le réactif de Zimmerman et les régions correspondantes ont été éluées par 10 ml d'ethanol ; l'extrait évaporé à sec a été chromatographié en couche mince dans le système CM_2 : les stéroïdes ont été localisés après exposition de la plaque dans une atmosphère saturée d'iode. Ils ont été élués par 5 ml d'acétone. Leur identité a été recherchée par la détermination des activités spécifiques des cristaux et de l'eau mère au cours de plusieurs cristallisations successives.

TABLEAU XX

Testostérone (T), androstènedione (Δ) et épitestostérone (EpiT), dans la fraction libre, en pourcent de la dose radioactive du ou des stéroïdes injectés : la dose injectée ($\times 10^6$ cpm) est indiquée entre parenthèses.

Expériences	^3H	^{14}C
<u>SIMO. (H. 25 ans)</u>		
1,2 ^3H -T (31) + ^{14}C - Δ (3,4)		
T	0,0036	0,0008
Δ	0,0050	0,0090
EpiT	$\leq 0,0006$	$\leq 0,0005$
<u>FEDJ. (H. 28 ans)</u>		
1,2 ^3H -EpiT (54) + 4 ^{14}C -T (2).		
T	$\leq 0,0006$	0,0040
Δ	0,0040	0,0070
EpiT	0,0060	$\leq 0,0006$
<u>DRA. (H. 47 ans)</u>		
^3H -T (50)		
T	0,0060	
Δ	0,0070	
EpiT	$\leq 0,0001$	

Identification de EpiT et T (sulfate et glucuronide) : sur colonne de célite (système C₁), EpiT et T sont mal séparées (Fig. 21). Ces deux stéroïdes ont été élués ensemble et chromatographiés en couche mince dans le système CM₆ (après addition de 20 µg de T et EpiT) ; après 3 migrations successives, la séparation est achevée ; chaque éluat, évaporé à sec, a été acétylé par l'anhydride acétique dans la pyridine et purifié en couche mince dans le même système CM₆. Leur identité a été apportée par la constance des activités spécifiques des cristaux et de l'eau mère au cours de deux cristallisations successives.

Résultats (tableaux XX à XXIV).

- Principaux métabolites.

Le principal métabolite urinaire de l'EpiT tritiée injectée est l'EpiT conjuguée à l'acide glucuronide. En effet, le pourcentage de transformation de l'EpiT en glucuronide d'EpiT urinaire est $18,7 \pm 4,2$ (M $\pm$ DS, n = 6), alors que le pourcentage de transformation de la testostérone en glucuronide de testostérone est de 1,23 (moyenne de 3 cas).

Le deuxième métabolite important de l'EpiT est le sulfate d'épitestostérone dont nous montrons son existence pour la première fois. Le pourcentage de conversion est de $2,07 \pm 0,19$ (M $\pm$ DS, n = 6) : dans les expériences d'injections simultanées d'EpiT tritiée et de ¹⁴C-T nous n'avons pu mettre en évidence la ¹⁴C-testostérone dans la fraction sulfate : si cette transformation existe, elle est $\leq 0,05$ %. Les critères particuliers d'identification

du sulfate d'EpIT ont été les suivants (expériences FERR. et TOUA.), dans l'ordre chronologique :

- extraction des sulfates sous forme de sulfates de pyridinium et de stéroïde,

- chromatographies successives, après addition de sulfate d'EpIT non radioactif, dans les systèmes A₃, C₅, C₆ et F₂,

- solvolysé de la fraction sulfate par l'acide perchlorique (0,02 ml) dans 20 ml de THF et 0,06 ml d'eau la solution est portée à l'ébullition à reflux pendant 45 min. Après refroidissement, nous ajoutons 2 ml de NH₄OH, N pour arrêter la réaction : après évaporation à sec, l'extrait est repris par 3 x 30 ml d'éther sulfurique, lavé avec NaOH N, H₂O et évaporé à sec,

- comportement chromatographique dans le système CM₆,

- acétylation par l'anhydride acétique ¹⁴C. (activité spécifique 1 mCi/mM),

- chromatographies de l'acétate d'EpIT doublement marqué dans les systèmes CM₆ et CM₂,

- activité spécifique constante dans les cristaux et dans l'eau mère au cours de deux cristallisations successives (tableau XXII).

- Métabolites secondaires.

Une autre différence importante dans le métabolisme de la testostérone et de l'épitestostérone est celle de la contribution respective de ces deux stéroïdes dans

la production urinaire de l'androstérone et de la 5 β -androstérone. En effet, cette transformation n'a pu être démontrée dans l'expérience HAMI. (tableau XXIII). L'activité spécifique et le rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ ont été déterminés après addition de 10 mg du stéroïde non radioactif et au cours de cristallisations successives : nous constatons que l'activité spécifique en ^{14}C est constante pour A et 5 β -A, après la deuxième cristallisation, mais que les résultats sont moins nets au niveau du tritium, surtout dans le cas de la 5 β -androstérone. Dans les expériences FEDJ. (tableau XXIV) et BELK., la conversion en A et 5 β -A à partir de l'épitéstostérone est certaine, bien que très faible ; elle est de 100 à 200 fois inférieure à celle provenant de la testostérone. La voie oxydative faisant intervenir un 17 α -hydroxystéroïde deshydrogénase est donc peu importante chez l'Homme dans les conditions physiologiques normales, après administration intraveineuse d'EpiT tritiée sous forme traceuse.

Dans un travail récent, Blaquier et al. (159) ont obtenu de l'épitéstostérone à partir de testostérone ou d'androstènedione en présence de tissu surrénalien ou de globules rouges humains : trouvant plus d'EpiT à partir de T que de Δ , ils envisagent l'existence d'une isomérase qui permettrait le passage direct réversible de T en EpiT.

Nous avons incubé des globules rouges humains avec de la testostérone tritiée suivant le protocole utilisé par Blaquier (159). Nous avons trouvé une transformation de T en EpiT de l'ordre de 0,02 %, c'est-à-dire nettement inférieure à celle mentionnée par cet auteur, donc ayant peu de signification physiologique et sans rapport avec le pourcentage obtenu (20 %) à partir des globules rouges de Mouton.

TABLEAU XXI

Radioactivité (^3H et ^{14}C) retrouvée dans les principaux métabolites cétoniques dans les urines des deux premiers jours (exprimée en pourcent de la radioactivité injectée).

Métabolites	HAMI		FEDJ.		FERR.		BELK.	TOUA.	DIAM.
	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H	^3H	^3H
G. EpIT	13,00	N.D.	25,20	N.D.	18,00	N.D.	17,30	16,40	22,20
S. EpIT	2,24	N.D.	2,26	N.D.	2,05	N.D.	1,73	2,15	2,00
G. T.	N.D.	0,53	N.D.	1,60	N.D.	1,55	N.D.	N.D.	N.D.
S. T.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
(S+G). A	$\leq 0,018$	8,00	0,048	8,85	N.M.	N.M.	0,05	N.M.	N.M.
(S+G). 5BA	$\leq 0,020$	16,45	0,086	18,42	N.M.	N.M.	0,06	N.M.	N.M.

N.D. : non décelé - ^3H : correspond à ^3H -EpIT
N.M. : non mesuré ^{14}C : correspond à ^{14}C -T.

G. : Glucuronide
S. : Sulfate

TABLEAU XXII

Rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ au cours de différentes cristallisations : dans l'acétate d'épitestostérone, après acétylation de l'épitestostérone provenant des fractions sulfo et glycuconjuguées dans l'expérience FERR. et de la fraction sulfate dans l'expérience TOUA.

Rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$	FERR.		TOUA.
	A. EpiT (glycuronide)	A. EpiT (sulfate)	A. EpiT (sulfate)
<u>1ère Cristallisation</u> (Méthanol)			
- eau mère	11	3,14	5,76
- cristaux	12,8	2,87	2,99
<u>2ème Cristallisation</u> (Cyclohexane)			
- eau mère	11,7	2,45	4,25
- cristaux	11	2,85	2,95
<u>3ème Cristallisation</u> (Méthanol)			
- eau mère	11,6	2,24	3,18
- cristaux	12,1	2,24	3,11

TABLEAU XXIII

Cristallisations de l'androstérone et du 5 β androstérone :
(exp. HAMIL.), après addition de 10 mg du stéroïde non radioactif.

	Activité spécifique				Rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$	
	Eau mère		Cristaux		Eau mère	Cristaux
	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H		
<u>Androstérone.</u>						
1ère crist. (cyclohexane)	1,45	0,54	1,71	0,240	0,37	0,140
2ème crist. (Méthanol)	1,00	0,15	1,00	0,080	0,15	0,080
3ème crist. (cyclohexane)	1,08	0,19	1,06	0,085	0,17	0,076
<u>5β-androstérone.</u>						
1ère crist. (cyclohexane)	5,35	6,90	2,29	1,17	1,28	0,58
2ème crist. (méthanol)	3,12	2,54	2,98	0,62	0,81	0,21
3ème crist. (méthanol)	3,04	1,34	2,87	0,45	0,39	0,15
4ème crist. (cyclohexane)	2,96	3,86	2,92	0,32	1,30	0,11

β - Métabolites non cétoniques.

Ils ont été étudiés dans les expériences FEDJ. (^3H EpiT + ^{14}C -T) et BELK. (^3H -EpiT). Chaque fraction non cétonique (sulfo ou glycuco-conjuguée) a été soumise à un gradient d'élution sur alumine dans le système A_2 , après addition des stéroïdes de référence : le 5β -A- 3α , 17α -diol que nous avons préparé, les 5α et 5β -A- 3α , 17β -diols et le 5α , 3β , 17β -diol. Etant donné que nous ne disposions pas du composé de référence 5α -A- 3α , 17α -diol, nous avons admis, par suite de l'impossibilité de séparer dans ce système le 5β -A- 3α , 17β -diol de son isomère 17α -ol, repéré par la coloration de Kägi-Misher (160), que le pic de radioactivité tritiée retrouvé dans le pic du composé de référence le 5α -A- 3α , 17β -diol correspondait à l'isomère 5α -A- 3α , 17α -diol (Fig. 25). Les deux zones radioactives tritiées obtenues dans le système A_2 , ont été évaporées à sec et chromatographiées dans le système CM_2 (plaque de 45 cm, durée 4 h 30) : les Rfs obtenus correspondaient à ceux donnés par Wilson et al. dans le même système pour les $5\alpha/5\beta$ -A- 3α , 17α -diols (161). La somme ($5\alpha + 5\beta$) A- 3α , 17α -diol (S + G) représentait environ 0,4 % de l'EpiT injectée dans l'expérience FEDJ. et 1,9 % dans l'expérience BELK. Le rapport $5\alpha/5\beta$ était inférieur à 1 dans les deux expériences (0,58 dans la première et 0,72 dans la deuxième) ; le tableau XXIV montre le bilan complet de l'expérience FEDJ.

L'ordre d'importance des métabolites est le suivant : G-EpiT $\geq$ S-EpiT $>$ ($5\alpha + 5\beta$) A- 17α -diol $>$ fraction de faible polarité $\geq$ A + 5β -A. Les principaux métabolites de l'épitestostérone ont donc gardé l'hydroxyle 17α .

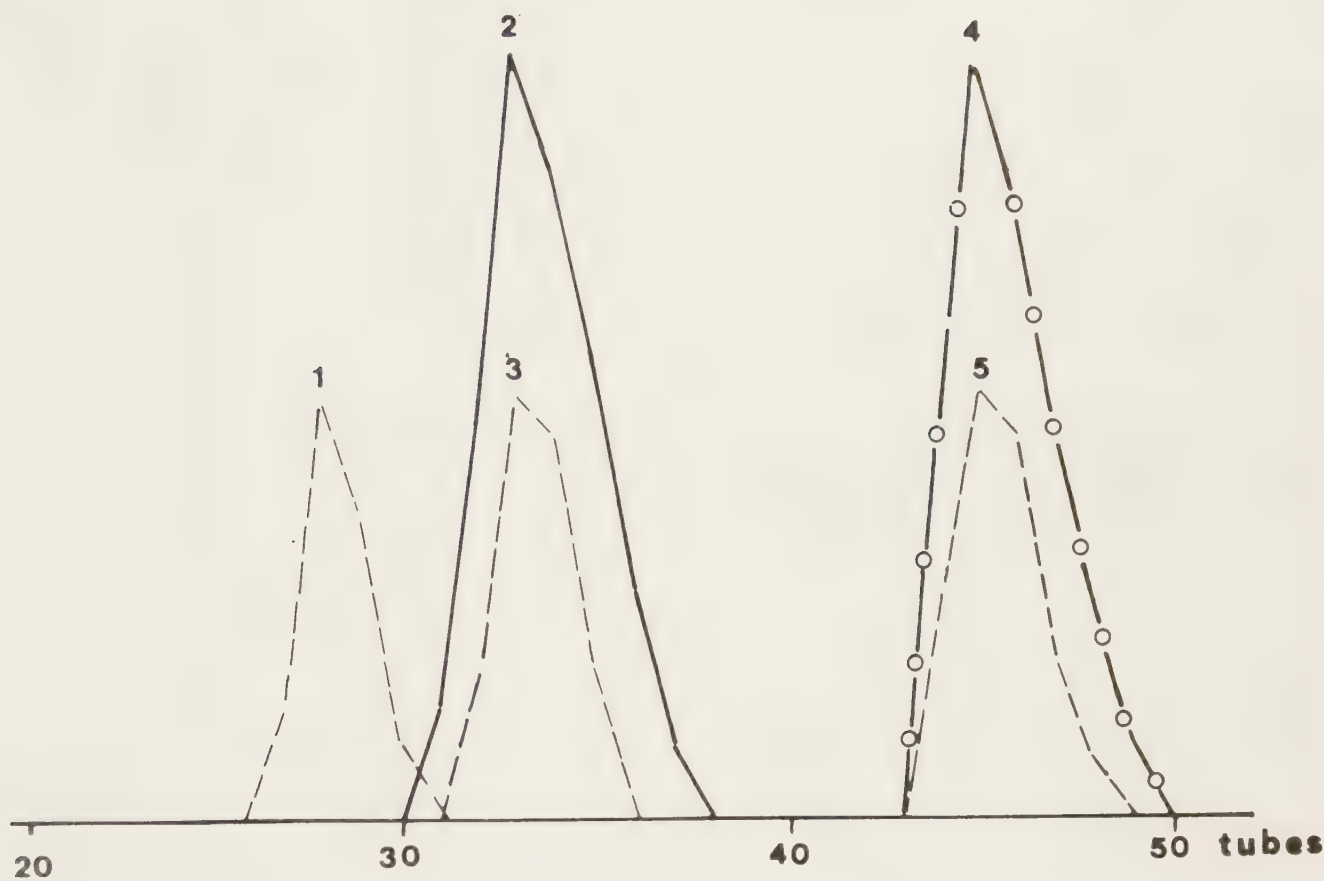


Fig. 25

Gradient sur colonne d'alumine Woëlm, 15 g à 4 % H_2O -
EtOH 6 % dans le benzène : XX gouttes/mn. Fractions de 10 ml.

- 1 - 5α -A- 3β ,17 β -diol non radioactif (composé de référence)
- 2 - 5α -A- 3α ,17 α -diol (métabolite urinaire tritié)
- 3 - 5α -A- 3α ,17 β -diol non radioactif (composé de référence)
- 4 - 5β -A- 3α ,17 β -diols - tritié (métabolite urinaire)
- non radioactif (composé de référence - Reaction de Käge-Misher +)
- 5 - 5β -A- 3α ,17 β -diol non radioactif (composé de référence).

TABLEAU XXIV

Expérience FEDJ. : injection simultanée de 54×10^6 cpm ^3H -EpiT
et de 2×10^6 cpm ^{14}C -T. Bilan des radioactivités urinaires
(^3H et ^{14}C) dans les différents métabolites isolés,
exprimé en pourcent de la dose injectée.

		^3H	^{14}C
<u>Stéroïdes libres.</u>			
- Δ^4		0,0040	0,0070
- EpiT		0,0060	$\leq 0,0006$
- T		$\leq 0,0006$	0,0040
<u>Stéroïdes sulfates.</u>			
Cétoniques.			
- Fraction peu polaire		0,020	-
- EpiT		2,260	-
- T		-	-
- Androstérone		0,008	0,45
- 5β -androstérone		0,016	0,42
Alcooliques.			
- Fraction peu polaire		0,04	-
- Androstenediol	17α	0,10	-
- 5β -androstenediol	17α	0,07	-
<u>Stéroïdes glucuronides.</u>			
Cétoniques.			
- Fraction peu polaire		0,80	-
- EpiT		25,20	-
- T		-	1,60
- Androstérone		0,04	8,40
- 5β -androstérone		0,17	18,00
Alcooliques.			
- Fraction peu polaire		0,26	
- Androstenediol	17α	0,30	17β 0,90
- 5β -androstenediol	17α	1,05	17β 6,00

Les $5\alpha/5\beta$ -A- 17α -diols ont également été retrouvés par Wilson et al. (161), après administration d'épitéstostérone à un homme. Fukushima et al. (162) ont isolé le dérivé 5β de l'urine d'un sujet atteint d'une hyperplasie surrénale congénitale ; Tai-Chan-Pung et al. (163) ont pu l'obtenir sous forme cristallisée à partir de 70 litres d'urine de sujet normaux : sa concentration était de l'ordre de 20 $\mu\text{g/litre}$. Le dérivé 5α -A- $3\alpha,17\alpha$ -diol retrouvé après administration d'EpiT n'a pas encore été signalé dans l'urine humaine : son existence est probable. Le problème à résoudre est celui de savoir si l'EpiT contribue seule à la formation de ces 17α -diols : nous verrons plus loin que le sulfate d'EpiT est également un précurseur de ces composés.

2 - Métabolisme comparatif de la testostérone et du sulfate de testostérone.

Une expérience a été réalisée chez un homme adulte sain âgé de 28 ans. 10×10^6 cpm de $1,2\text{-}^3\text{H-T}$ et 1×10^6 cpm de sulfate de $4\text{-}^{14}\text{C-T}$ ont été injectés par voie endoveineuse et les urines recueillies chaque jour pendant 5 jours. Après hydrolyse chlorydrique à chaud, nous avons trouvé 77 % de tritium et 11,4 % de ^{14}C dans la totalité des urines de 5 jours. L'hydrolyse enzymatique par le suc d'*Helix Pomatia* (SHP) n'a permis de retrouver que 1,8 % de ^{14}C : la sulfatase contenue dans le SHP est faiblement active sur cet ester sulfate. L'étude des différentes fractions a permis d'identifier les trois principaux métabolites ^{14}C (tableau XXV).

- le sulfate de testostérone
- le sulfate de 5α -androsterone
- le sulfate de 5β -androsterone.

TABLEAU XXV

Administration simultanée de ^3H -T et de ^{14}C -ST. Pourcentage de la radioactivité ^3H ou ^{14}C calculé dans chaque métabolite identifié.

% de la radioactivité injectée	^3H -T	^{14}C -ST
<u>Fraction sulfate.</u>		
Cétoniques.		
- 3β androstérone	2,00	-
- Androstérone	2,45	0,32
- 5β androstérone	0,25	1,80
- Testostérone	-	3,45
Alcooliques	0,30	0,45
<u>Fraction glucuronide.</u>		
Cétoniques.		
- Androstérone	9,50	-
- 5β androstérone	9,80	-
- Testostérone	0,50	-
Alcooliques.		
- Androstanediol	1,60	0,10
- 5β androstanediol	3,60	0,30
<u>Total</u>	30 %	6,42 %

Le rapport $5\alpha\text{-A}/5\beta\text{-A}$ de la fraction sulfate est de 6 à partir du ^{14}C et de 0,1 à partir du tritium. On peut donc supposer un métabolisme "direct" du sulfate de testostérone en sulfate d'androstérone et sulfate d'étiocholanolone, avec une prépondérance de ce dernier.

Si nous comparons le profil métabolique du sulfate de testostérone avec celui obtenu après injection intraveineuse du glucuronide de $4\text{-}^{14}\text{C}$ testostérone, les différences sont nettes (tableau IV) :

- radioactivité urinaire plus élevée,
- absence de dérivé 5α ,
- prédominance du dérivé non cétonique, 5β -androstènediol.

3 - Métabolisme du sulfate d'épitestostérone.

Expérience MOUT. : (injection intraveineuse de 40×10^6 cpm de sulfate de $1,2\text{-}^3\text{H}$ épitestostérone à un homme adulte sain).

On retrouve en 3 jours 62 % de la radioactivité injectée, dont 96 % le 1er jour. L'élimination urinaire est donc moins importante à partir du sulfate qu'à partir de l'EpiT libre et cette radioactivité s'élimine plus rapidement. L'étude des différentes fractions urinaires (tableau XXVI) montre que le métabolisme du sulfate d'EpiT est très réduit, puisque la radioactivité est retrouvée surtout sous forme inchangée (74 %). L'EpiT retrouvée dans l'hydrolysât enzymatique a été identifiée par les critères habituels (formation d'acétate et activité spécifique constante des cristaux au cours de cristallisations répétées). Cependant

TABLEAU XXVI

Radioactivité exprimée en % de la dose injectée, retrouvée
en 3 jours dans les différentes fractions isolées après
administration intraveineuse de sulfate d'épitestostérone
tritiée (40×10^6 cpm).

<u>Radioactivité urinaire.</u>	62,00
<u>Fraction libre.</u>	0,37
<u>Fraction glycuronide.</u>	1,00
(Ketodase)	
- Stéroïdes peu polaires	0,30
- Epitestostérone	0,03
- Stéroïdes plus polaires	0,50
<u>Fraction sulfate.</u>	26,00
(Solvolyse)	
- Stéroïdes peu polaires	0,10
- Epitestostérone	19,30
- Stéroïdes plus polaires	2,60
<u>Total</u>	<u>27,37</u>

le faible pourcentage retrouvé ne permet pas d'affirmer que l'EpiT ainsi identifiée était bien glycuco-conjuguée.

4 - Aromatisation de ST, EpiT, S-EpiT.

Nous avons montré que la testostérone radioactive administrée par voie intraveineuse à une femme enceinte au 3ème trimestre de grossesse, était transformée en oestrogènes (8) et que l'incubation de testostérone radioactive avec des tranches de placenta humain (sans addition de cofacteurs) entraînait la formation d'oestrone (environ 20 %) et d'oestradiol (5 %). Il était intéressant de comparer les possibilités d'aromatisation de la testostérone avec celles de son ester-sulfate : dans les mêmes conditions d'étude (in vivo et in vitro), le sulfate de testostérone ne se transforme pas en oestrogènes. D'autre part, l'administration intraveineuse de 1,2-²H-EpiT ou de sulfate 1,2-³H-EpiT à une femme gravide près du terme n'a pas montré de transformation en oestrogènes, de même que l'incubation de ces mêmes stéroïdes avec des tranches de placenta humain. L'analyse des fractions oestrogéniques (oestrone, oestradiol 17 β , oestriol) a été faite selon la technique de Bauld (164).

5 - Essais d'identification de composés de faible polarité (X_1 et X_2).

a - Arguments de parenté avec les $\Delta 16-C_{19}$ -stéroïdes.

Au cours des différentes expériences métaboliques, nous avons constaté l'existence de deux composés de polarité plus faible que celle de l'androstènedione ou de l'acétate d'EpiT ou de T, sur colonne de partage. Ces composés (X_1 et X_2) étaient retrouvés dans les fractions sulfate et glucuronide, mais non dans la fraction libre. Ces produits étaient formés in vivo, car après addition de précurseur tritié (T, Δ ou EpiT) à une urine témoin et réalisation du protocole d'isolement, l'existence de tels composés n'a pu être observée. Nous avons pensé à la possibilité de formation d'un dérivé $\Delta 16-C_{19}$. Les données de la littérature nous y incitaient.

En effet, en 1944 Prelog et al. (165, 166) ont isolé deux sténols, l'androst-16-èn- 3α -ol ou An (α) et l'androst-16-èn- 3β -ol ou An (β) de testicules de porc, préparé différents composés $\Delta 16$ à partir de dérivés C_{19} et C_{18} et signalé l'odeur remarquable de certains d'entre eux, particulièrement ceux de la série androstane. Par la suite, l'An (α) a été trouvé dans l'urine humaine normale (167), dans l'urine de femmes présentant une tumeur surrénale (168), un lutéome de l'ovaire (169) ou une hyperplasie surrénale (170).

La nature du ou des précurseur(s) des composés $\Delta 16$ n'est pas complètement élucidée. Les expériences de Stylianou et al. (171, 172) au cours desquelles la testostérone était transformée faiblement en androsta-4,16-dièn-3-one et en An (β), ont conduit ces auteurs à suggérer que les éléments de l'eau étaient formés à partir d'un hydrogène du carbone 16 et de l'OH porté par le carbone 17 de la testostérone. La réduction de la double liaison du noyau A pourrait alors conduire aux $\Delta 16$ -androstèn-3-ols. Dorfman (173) en conséquence, a postulé que An (α) était le métabolite spécifique de la testostérone ; mais des expériences faites dans de nombreux laboratoires (174, 175) n'ont pu confirmer ce point de vue. Par contre la formation de An (α) a été montrée in vivo chez une femme atteinte d'une tumeur surrénale virilisante, à partir du cholestérol via la prégnénolone (176). Ces résultats sont en accord avec d'autres études (177, 175) dans lesquelles l'administration d'ACTH aux hommes normaux entraîne une excrétion urinaire accrue de l'An (α). Enfin les résultats d'études faites chez le Rat et l'Ours plaident en faveur du rôle précurseur de la prégnénolone et de la progestérone, dans la formation des dérivés $\Delta 16$ (178, 179).

b - Protocole expérimental.

Le protocole suivi a comporté les étapes suivantes : extraction des stéroïdes libres, solvolysé et hydrolyse par SHP ou hydrolyse par la kétodase et solvolysé. Le tableau XXVII montre que ces deux composés sont retrouvés dans toutes les expériences réalisées et que leur formation est plus importante à partir de T ou Δ qu'à partir d'EpiT ou de sulfate d'EpiT.

TABLEAU XXVII

Radioactivité exprimée en % de la dose administrée, retrouvée
dans les composés de faible polarité (X_1 et X_2)

Expériences	Stéroïdes	x 10^6 cpm	X_1 (S+G)	X_2 (S+G)
LANF.	^3H -EpiT	40 (i.v)	0,01	0,10
LUCA.	^3H -EpiT	54 (per os)	0,03	0,025
SOUM.	S- ^3H -EpiT	20 (i.v)	0,015	0,010
SIMO.	$\left\{ \begin{array}{l} ^3\text{H-T} \\ ^{14}\text{C-}\Delta \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 32 \\ 3,4 \end{array} \right.$ (i.v)	$\left\{ \begin{array}{l} 0,04 \\ 0,09 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0,80 \\ 0,70 \end{array} \right.$
DRA.	^3H $\Delta+\Delta$ (200mg)	10 (i.v)	0,11	0,62

c - Critères chromatographiques.

Différents systèmes chromatographiques ont été utilisés et les composés $\Delta 16$ de référence suivants ont été utilisés :

- 5 α -androsta-16-èn-3 α -ol - An (α)
- 5 α -androsta-16-èn-3 β -ol - An (β)
- 5 β -androsta-16-èn-3 α -ol - Ae
- androsta-4,16-dièn-3-one
- androsta-5,16-dièn-3 β -ol - An dien

Le système C_3 permet de bien séparer X_1 de X_2 et de les situer respectivement par rapport à différents composés $\Delta 16$ (Fig. 26). Ce document montre que le composé X_1 a une polarité presque identique à celle de l'androsta-4,16-dièn-3-one et que X_2 plus polaire que X_1 passe entre An (β) et An (dien). Les autres systèmes utilisés, sur colonne d'alumine (système A_3), en couche mince (CM_2 , CM_4 , CM_5), en chromatographie gazeuse sur SE 30 - 3 % à 225°C ou NGS 1 % à 220°C, n'ont pas permis de séparer X_1 de l'androsta-4,16-dièn-3-one et X_2 de An (α) et An (β).

d - Critères d'identification.

α - Le composé X_1 :

- se complexe avec le réactif T de Girard,
- absorbe dans l'ultraviolet,
- ne donne pas d'acétate,
- donne deux méthoximes.

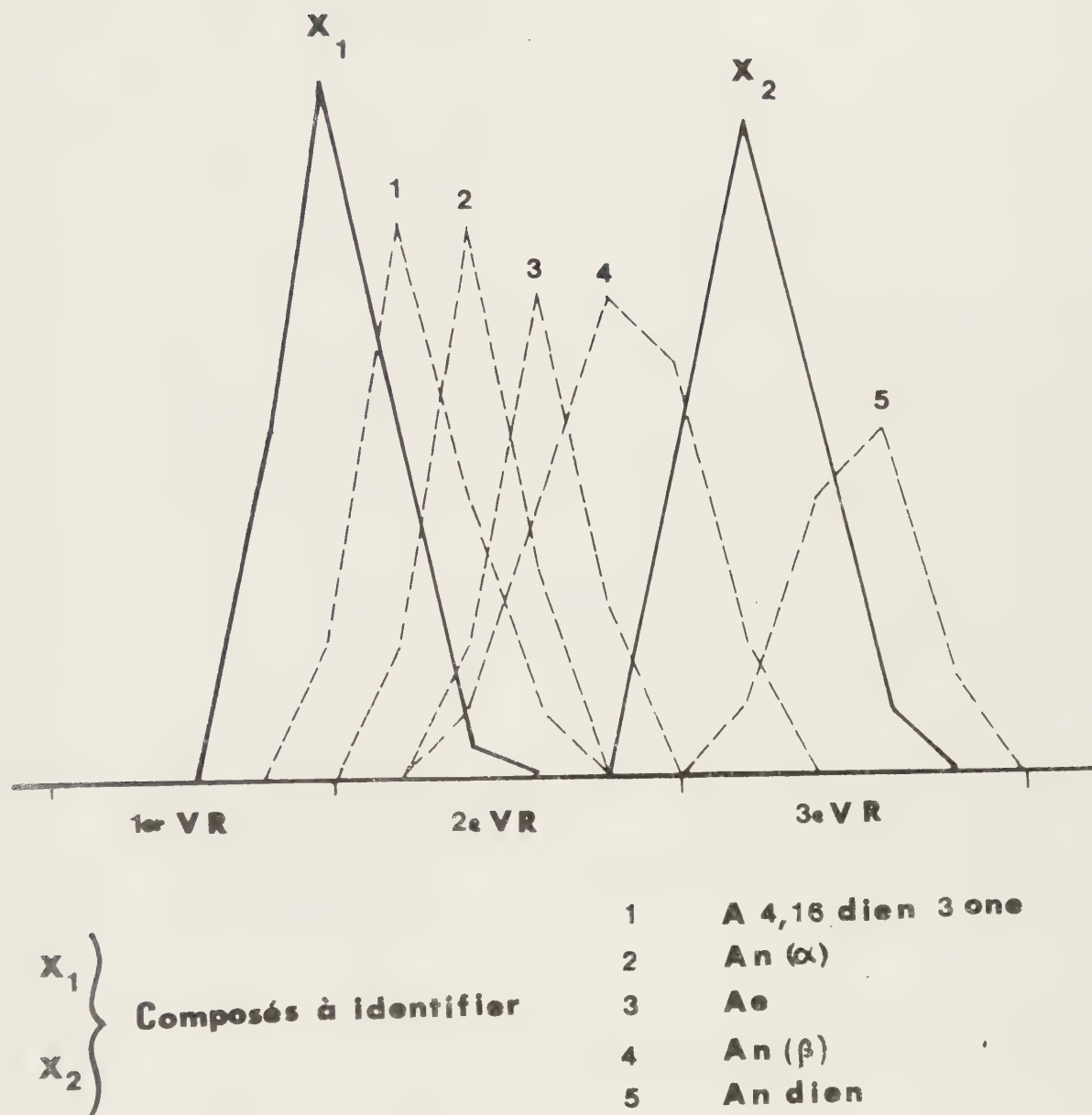


Fig. 26

Reconstitution de l'emplacement des pics des $\Delta 16C_{19}$ stéroïdes de référence et des 2 métabolites X_1 et X_2 à identifier. Colonne de célite 10 g, système C_3 (hexane-diméthylformamide).

β - Le composé X_2 :

- ne réagit pas avec le réactif T de Girard,
- possède un OH acétylable,
- ne donne pas de méthoximes.

γ - Le rapport isotopique $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ dans l'expérience SIMO. était de 4 dans X_1 et de 10 dans X_2 , c'est-à-dire, sensiblement égal au rapport d'injection qui était de 9,4. Ce résultat fait supposer l'introduction d'une double liaison dans le noyau A du composé X_1 .

δ - Le spectre de masse de X_2 montre un poids moléculaire de 274 (Fig. 27) et une fragmentation analogue à celle d'un composé $\Delta 16$ -androstane-3-ol (Fig. 19). L'étude de cette fragmentation a été faite par comparaison avec celle du 5 α -androstane-3 α -ol (Fig. 28 et 29). Nous étions donc tentés d'admettre qu'il s'agissait du 5 α -androst-16-ène. Malheureusement, la figure 26 montre que le composé ne correspond à aucun des $\Delta 16$ -stéroïdes testés : il en est de même du composé X_1 .

Cependant ces résultats permettent non seulement de confirmer que la $\Delta 16$ -androstène-3 α -ol n'est pas chez l'Homme un métabolite périphérique de la testostérone mais aussi de montrer qu'elle n'est pas un métabolite périphérique de l'épitestostérone ni de l'androstènedione.

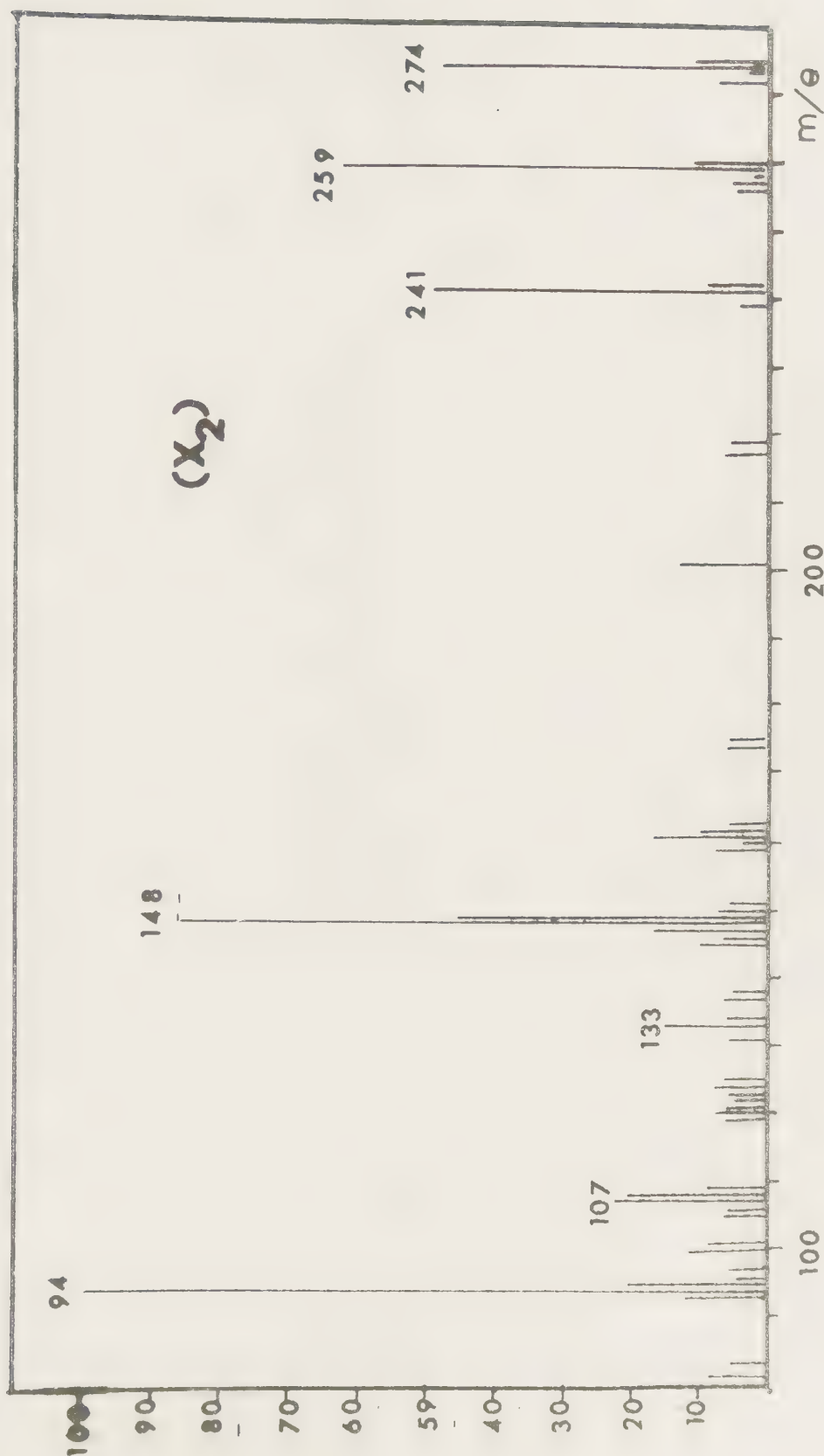


Fig. 27

Spectre de masse du composé X_2 de faible polarité, trouvé dans l'urine, après administration de T, $\Delta 4$ ou EpiT.

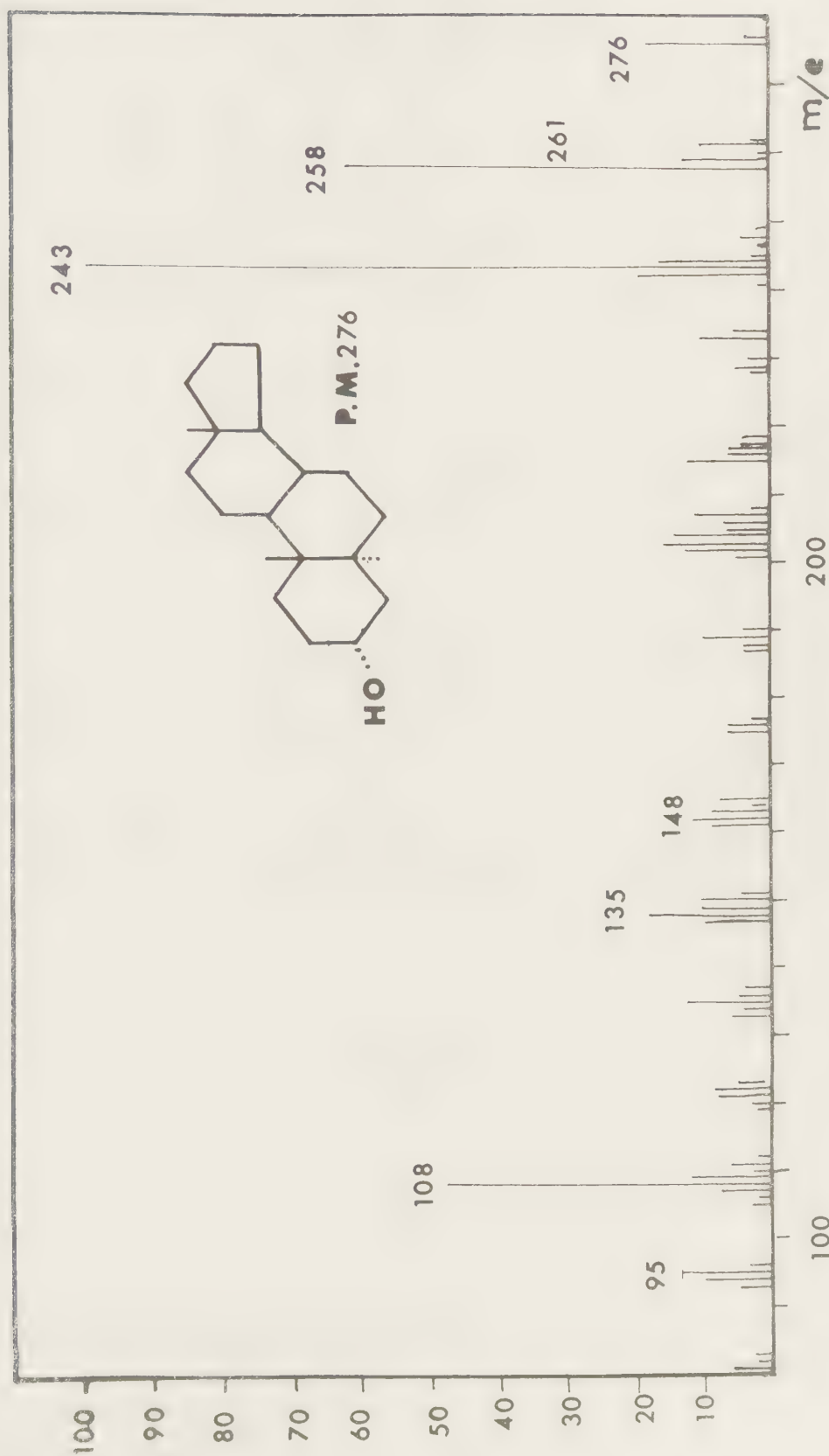
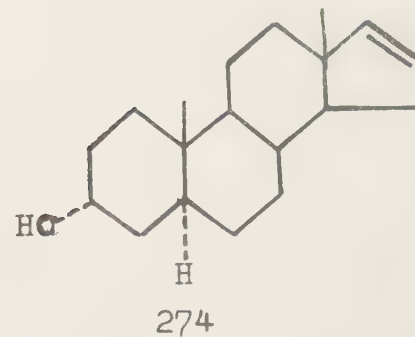
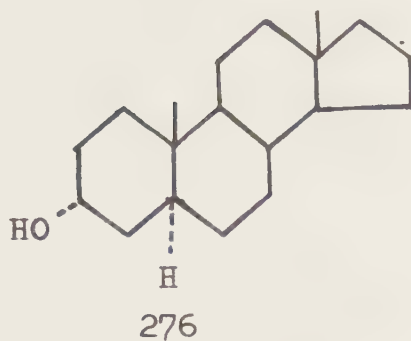


Fig. 28

Spectre de masse du composé de référence 3α-OH-androstane.

Androstane-3 α -ol

3 α -OH-androst-16-ène



m - 15

- CH₃

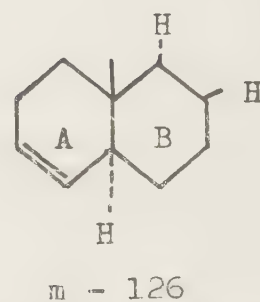
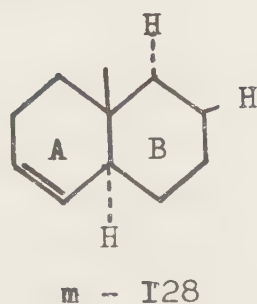
- CH₃

m - 33

- (CH₃ + H₂O)

- (CH₃ + H₂O)

m/e 148



m - 141

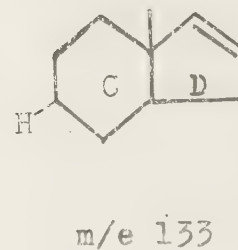
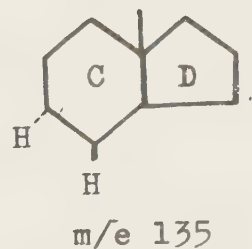


Fig. 29

Représentation des fragments obtenus après spectrométrie de masse du 3 α -OH-androstane et du 3 α -OH-androst-16-ène.

B - TAUX PLASMATIQUE ET URINAIRE DE T ET EPIT
(LIBRES ET SULFATES)

L'étude du métabolisme de l'épitestostérone tritiée fait admettre l'existence d'épitestostérone dans la fraction sulfate de l'urine.

Ce fait nous a conduit d'une part à vérifier l'existence de sulfate d'épitestostérone dans le sang et dans les urines et à en apprécier le taux, et d'autre part de comparer la clearance métabolique (MCR) de la testostérone et de l'épitestostérone (libres et sulfates).

1 - Etude des concentrations plasmatiques de T et EpiT (libres et sulfates).

Le sang veineux a été prélevé sur héparine chez 4 hommes adultes en bonne santé apparente ; le plasma décanté et rassemblé, représentait un volume de 500 ml. Le tableau suivant montre la nature des traceurs radioactifs ajoutés à l'anhydride acétique utilisé.

Stéroïde		Anhydride acétique
Nature	Activité spécifique	
4- ¹⁴ C-T	64 x 10 ³ dpm, 130 ng	³ H - 100 mCi/mM
4- ¹⁴ C-S.EpiT	138 " , 300 ng	³ H - 100 mCi/mM
1,2- ³ H-EpiT	140 " , 190 ng	¹⁴ C - 29 mCi/mM
1,2- ³ H-ST	348 " , 8 ng	¹⁴ C - 10 mCi/mM

Le protocole adopté est schématisé dans la Fig. 30 : les étapes de purification des acétates et de leurs méthoximes sont celles déjà décrites au chapitre consacré à la testostérone plasmatique. Le tableau XXVIII indique une concentration élevée de sulfate d'épitestostérone, qui est dans cette expérience du même ordre de grandeur que celle de la testostérone. La concentration du sulfate de testostérone est comparable à celle donnée par Saez et al. (41). L'épitestostérone libre n'a pu être mesurée par cette méthode puisque la valeur trouvée s'annule après déduction du témoin aqueux. Nous verrons plus loin que nous avons pu déduire une estimation indirecte de la concentration plasmatique de l'épitestostérone, par la connaissance du MCR et de la production urinaire.

Les microquantités de sulfates de stéroïde que nous devions dosées ne nous ont pas permis d'utiliser les critères classiques d'identification. Cependant nous pensons avoir accumulé assez d'arguments :

- colonne de partage sur célite pour séparer les stéroïdes libres des sulfates,
- colonne d'adsorption sur alumine pour séparer les sulfates des glucuronides,
- solvolysé de la fraction sulfate,
- colonne de partage sur célite et chromatographie en couche mince sur alumine des stéroïdes ainsi libérés : à ce stade, T et EpiT sont nettement séparées entre elles et de A, D, 5 β -A, EpiA, prégnénolone, et 17 α -OH-prégnénolone : ces divers stéroïdes existent dans le plasma sous forme sulfate.

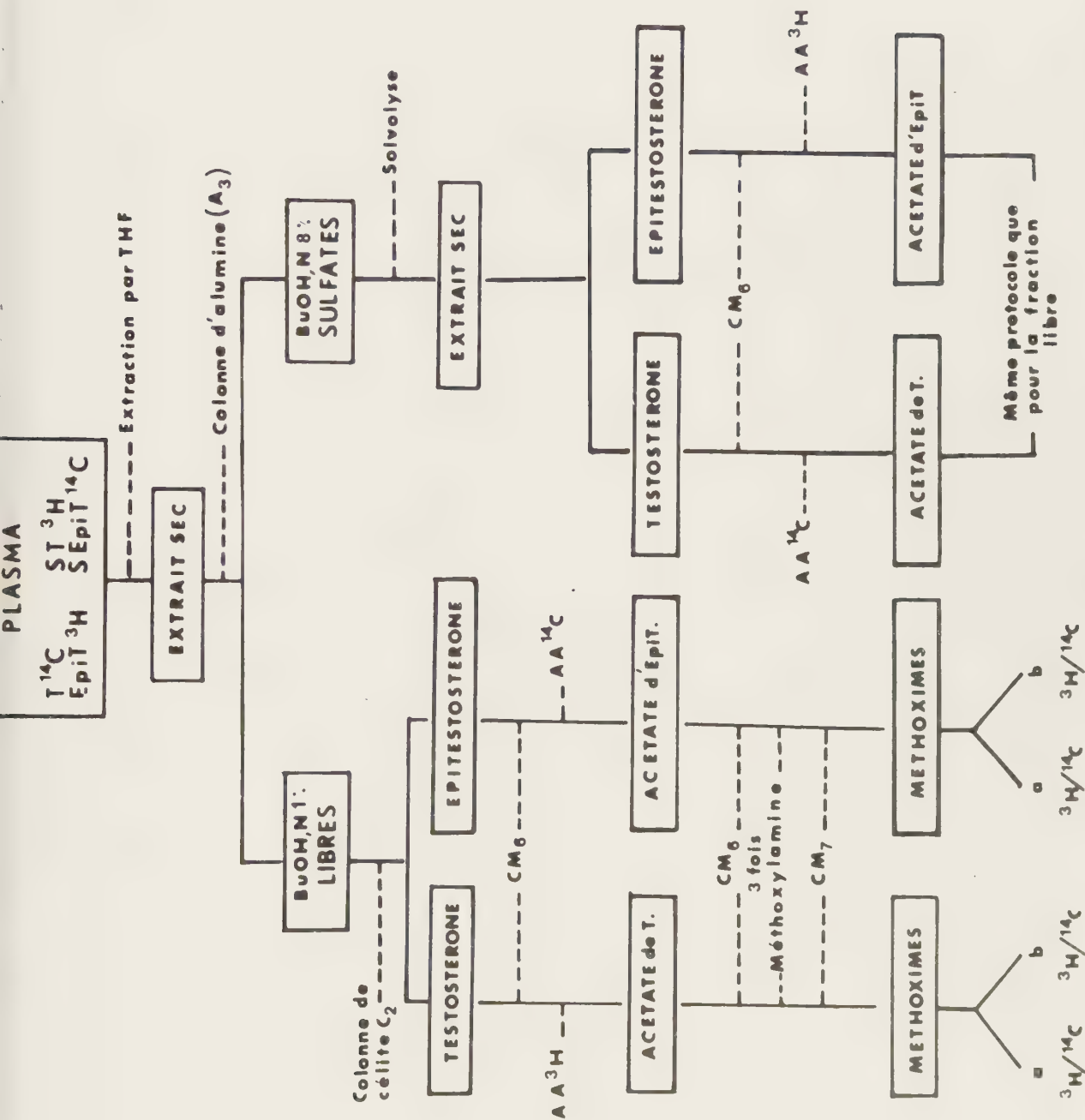


Fig. 20

Dosages par double dilution isotopique de la testostérone et de l'épitéstostérone (libres et sulfates), à partir d'un volume de 500 ml de plasma d'hommes adultes : l'extraction a été réalisée par 3 x 500 ml de tétrahydrofurane (THF).

TABLEAU XXVIII

Concentrations plasmatiques en $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ d'EpiT, S.EpiT, T, ST. La valeur du blanc aqueux pour chaque stéroïde a été déduite.

$\mu\text{g}/100\text{ ml}$	Blanc aqueux	Plasma
Epitestostérone	30	≤ 30
Sulfate d'EpiT.	68	420
Testostérone	20	470
Sulfate de testostérone	16	120

- comportement chromatographique des acétates,
- constante du rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ dans les 2 isomères méthoximes de l'acétate de T ou d'EpiT : l'existence de 2 isomères éliminant de ce fait un stéroïde n'ayant qu'une cétone en 17 ou en 20,
- constance de ce rapport après recristallisation des acétates (tableau XXIX).

2 - Etude des concentrations urinaires de T et EpiT (sulfates et glucuronides).

La même technique par double dilution isotopique a été mise au point (163, 164) : la prise d'essai est de 1/10 du volume de l'urine de 24 h chez l'homme et 1/2 volume chez la femme. Après extraction des stéroïdes libres, 25 à 50 000 dpm de 1,2- ^3H -T, 1,2- ^3H -EpiT et 1,2- ^3H -EpiT-sulfate, sont ajoutés à l'urine. Après 48 h d'hydrolyse par la kétodase à pH 5 et à 37°C, la phase aqueuse est extraite par CHCl_3 (2 x v) ; l'extrait chloroformique est lavé avec NaOH, N (2 x v/10) et avec H_2O (1 x v/10). L'extrait est évaporé à sec, et chromatographié sur colonne de célite dans le système C_2 : une fraction aliquote (1/20e de chaque tube) est sacrifiée pour repérer exactement l'emplacement de T et EpiT : l'éluat correspondant à chaque stéroïde est évaporé à sec et chromatographié dans le système CM_6 , puis acétylé par de l'anhydride acétique ^{14}C (4 mCi/mM). La purification des acétates, la formation et la purification des méthoximes de ces acétates sont réalisées dans les conditions déjà décrites. L'excrétion de l'épitestostérone (S + G) est supérieure à celle du glucuronide de testostérone dans les 3 cas présentés dans le tableau XXX.

TABLEAU XXIX

Epitestostérone et testostérone de la fraction sulfate du plasma. Rapports $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ trouvés dans les acétates d'épitestostérone et de testostérone au cours de 3 cristallisations successives et dans leurs méthoximes, respectivement dans l'extrait plasmatique et dans le témoin aqueux.

$^3\text{H}/^{14}\text{C}$	EpiT		T	
	Plasma	Témoin	Plasma	Témoin
ACETATE				
Avant cristallisation	8,3	1,3	0,8	16
1ère cristallisation				
- eaux-mères	8,0	1,3	0,9	13
- cristaux	8,5	1,2	0,7	16
2ème cristallisation				
- eaux-mères	7,9	1,2	0,8	14
- cristaux	8,1	1,1	0,7	16
3ème cristallisation				
- eaux-mères	8,0	1,1	0,7	13
- cristaux	7,9	1,1	0,7	15
O-METHOXIMES D'ACETATE.				
- isomère 1	7,5	1,3	0,8	15
- isomère 2	7,8	1,3	0,9	14

TABLEAU XXX

Excrétions urinaires en mg/24h du glucuronide de testostérone,
du sulfate et du glucuronide d'épitestostérone, chez l'homme
adulte normal.

	Age	G T	G EpiT	S EpiT
HAMI.	20	38	46	25
CHAU.	23	121,5	137	N.D.
ABBA.	20	55	40	26
LETO.	26	72	208	N.D.
LAGO.	27	65	222	N.D.
CORV.	27	92	47	N.D.
Moyenne		0,74	1,16	
± 1 DS		0,28	0,78	

N.D. : non dosé.

C - CLEARANCES METABOLIQUES (MCR) de T, EPIT,
(LIBRES ET SULFATES)

Le MCR est le volume de plasma épuré complètement et irréversiblement du stéroïde par unité de temps. Il peut être mesuré après perfusion continue ou après injection unique du stéroïde radioactif, à dose traceuse. L'aspect théorique et les conditions expérimentales d'étude ont été envisagés par Tait (180, 181).

Protocole expérimental.

a - Perfusion à débit constant.

Le stéroïde tritié, d'activité spécifique élevée environ 50 Ci/mM, est mis en solution dans du sérum physiologique à 8 % d'éthanol à une concentration de 0,25 à 0,35 μ Ci/ml. Le sang est prélevé sur héparine avant le début de la perfusion pour y mesurer la concentration du stéroïde endogène par double dilution isotopique. Au temps $t = 0$, 10 ml de la solution sont injectés (2,5 à 3,5 μ Ci) par voie endoveineuse en 2 mn. Au temps $t = 30$ mn, la solution radioactive est perfusée à débit constant à l'aide de l'appareil de Braun (0,5 ml/mn) pendant une période de 65 mn. Au temps $t = 50, 70$ et 90 mn, nous prélevons 50 ml de sang sur héparine. La constance du débit et celle de la concentration radioactive sont appréciées sur une période de 2 mn avant et après la perfusion. La tubulure en polyéthylène est restée au contact de la solution depuis la veille et, avant la vérification du débit, nous faisons écouler 5 ml de la solution : ces précautions permettent d'échapper aux variations de concentration dues à l'absorption du stéroïde sur

la paroi du tube (182). A chaque échantillon plasmatique, nous ajoutons une quantité connue du même stéroïde injecté, marqué avec du ^{14}C afin d'établir le rendement global de la technique : celle-ci est la même que celle utilisée pour doser le stéroïde endogène jusqu'à l'étape qui précède l'acétylation. Nous mesurons finalement la radioactivité contenue dans les tubes du pic de la dernière chromatographie. Le MCR, dans ce cas, est donné par la formule :

$$\text{MCR} = \frac{\text{Production mg/24 h}}{\text{Concentration mg/L}} = \frac{\text{R}^{\text{X}} \text{ perfusée/temps}}{\text{cpm du stéroïde/volume}} \quad (1)$$

b - Injection unique du stéroïde radioactif.

Le stéroïde tritié (20 à 40 μCi) dilué comme précédemment est injecté en une minute. Les prélèvements sont effectués toutes les dix minutes au début, puis toutes les 15 minutes (au total : 8 prélèvements).

L'évaluation de la radioactivité retrouvée dans le pic chromatographique correspondant au stéroïde injecté est obtenue selon le même protocole que précédemment. Sur papier semi-logarithmique, on porte en abscisse le temps, en ordonnée la radioactivité en pourcent de la dose injectée par litre de sérum.

La courbe de disparition de la radioactivité (mesurée spécifiquement en tant qu'hormone) dans le plasma,

après injection unique de l'hormone marquée doit être représentée par au moins deux exponentielles :

$$\text{alors, } x' = A' e^{-\alpha t} + B' e^{-\beta t} \quad (2)$$

x' étant la concentration radioactive du plasma, exprimée en fraction de la dose injectée par litre,

$$\text{et MCR} = \frac{1}{\int_0^{\infty} x' dt} + \frac{\alpha\beta}{A' \cdot B'} \quad (3)$$

où A' , B' , α et β peuvent être trouvés à partir des caractéristiques de la courbe de disparition.

Si l'on représente $\log_e x'$ en fonction de t , au temps $t = 0$, $\log x' = \log_e (A' + B')$.

Pour un temps suffisamment grand, le terme $A' e^{-\alpha t}$ de (2) est négligeable (lorsque $\alpha > \beta$) et β représente la pente. L'intersection à l'ordonnée de la dernière partie de la courbe donne $\log_e B'$. A partir des valeurs de B' , β' et x' , $\log_e (x' - B' e^{-\beta t})$ peut être représenté en fonction du temps : la pente de cette courbe est α et l'intersection à l'ordonnée est $\log A'$.

La relation entre α ou β et $\tau_{1/2}$ est donnée par l'équation :

$$\alpha \text{ ou } \beta = \log_e \frac{2 \times 1440 \text{ (mn)}}{\tau_{1/2} \text{ (mn)}} = \frac{1000}{\tau_{1/2}} \quad (4)$$

Résultats.

Une étude comparative de la valeur du MCR selon les 2 techniques a été réalisée chez un même sujet, qui présentait une hyperthyroïdie évolutive ; nous avons trouvé un MCR à 900 litres après perfusion à débit constant et 880 litres après injection unique ; étant donné l'absence de différence importante, l'une ou l'autre méthode a été choisie selon l'information recherchée.

Les figures 31, 32, 33 représentent les courbes de disparition plasmatique de la testostérone, de l'épitestostérone tritiée et de leurs sulfates chez l'homme adulte sain, après injection unique. Le tableau XXXI montre les résultats d'une part, du MCR en L/24 h et en L/24 h/m² de surface corporelle et d'autre part, de l'affinité de liaison pour les protéines sériques (1/P) de chaque stéroïde étudié. Nous avons ajouté l'affinité de liaison du sulfate de DHA que nous avons mesurée et la valeur du MCR du S-DHA trouvée par Wang et al. (183). Une discussion des relations entre MCR et affinité de liaison de la testostérone trouvera sa place au chapitre VI .

Cependant nous pouvons remarquer que le MCR de l'épitestostérone est très élevé et comparable à la valeur du flux sanguin hépatique : il semble donc que l'épitestostérone soit épurée complètement après un seul passage à travers le foie. L'activité de liaison ($\Delta 1/P$) EpiT est très faible, laissant prévoir l'absence d'une liaison à une protéine spécifique. D'autre part, le sulfate de testostérone a le MCR le plus faible des MCR des sulfates étudiés et en même temps l'affinité (1/P) et l'activité de liaison ($\Delta 1/P$) les plus fortes.

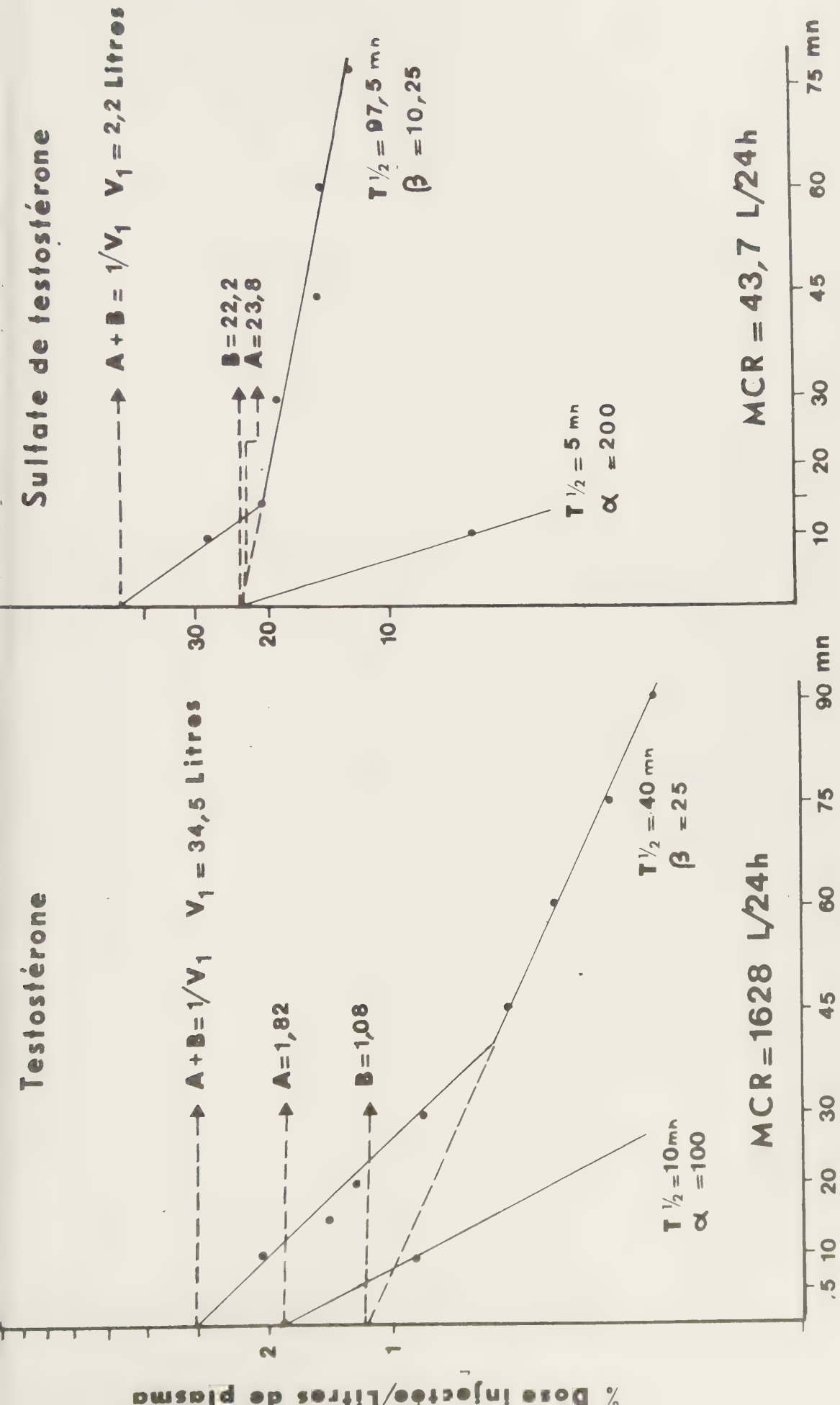


Fig.. 31

Clearances métaboliques (MCR) de la testostérone et du sulfate de testostérone établies après injection unique du stéroïde tritié, chez le même homme âgé de 30 ans.

→ $A+B=1/V_1$ $V_1 = 7$ Litres

→ $A+B=1/V_1$ $V_1 = 7$ Litres
→ $A=14,73$

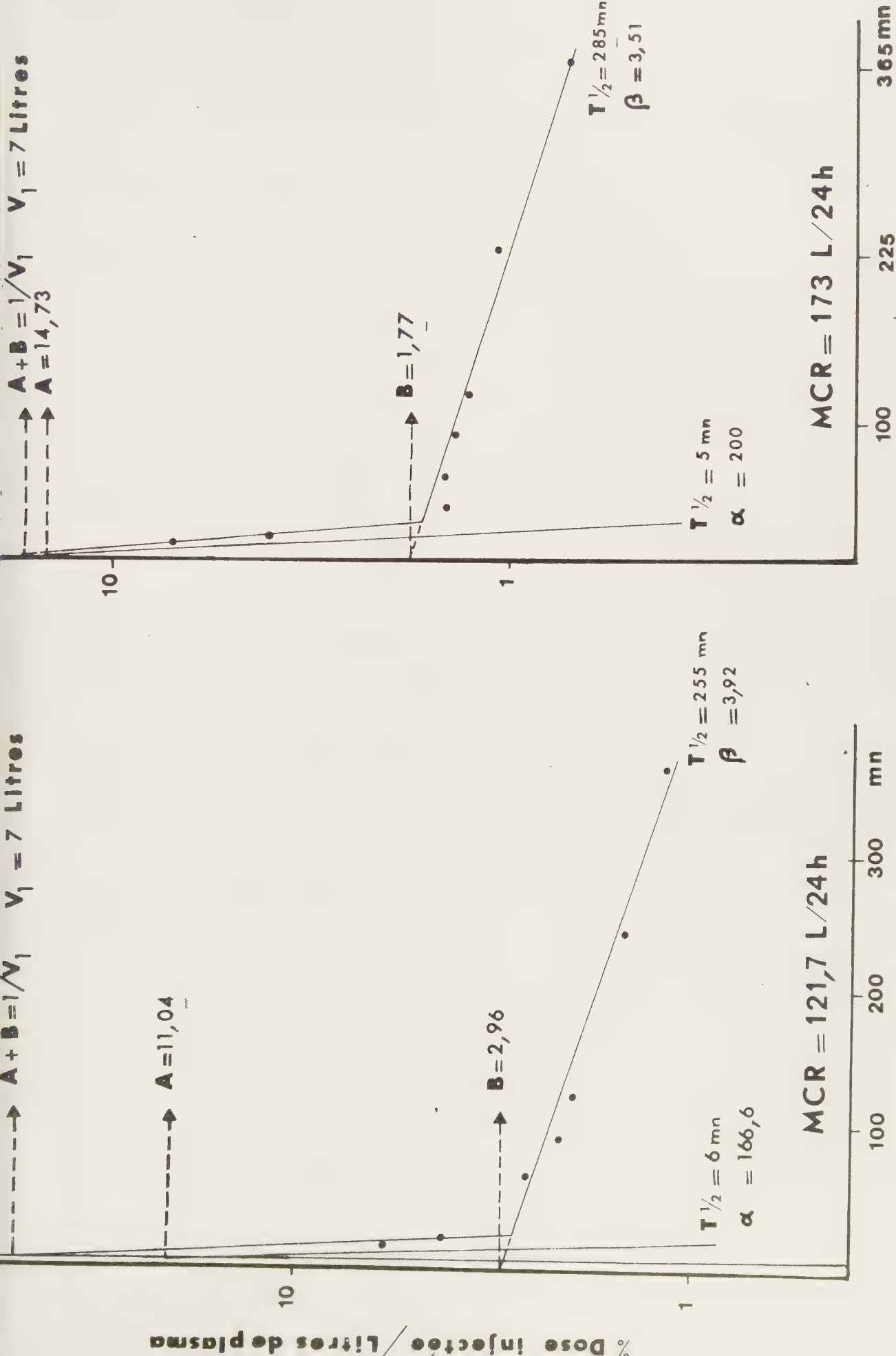


Fig. 32

Clearances métaboliques (MCR) du sulfate d'épitéstostérone, établies après injection unique du stéroïde tritié chez 2 hommes âgés de 28 à 35 ans.

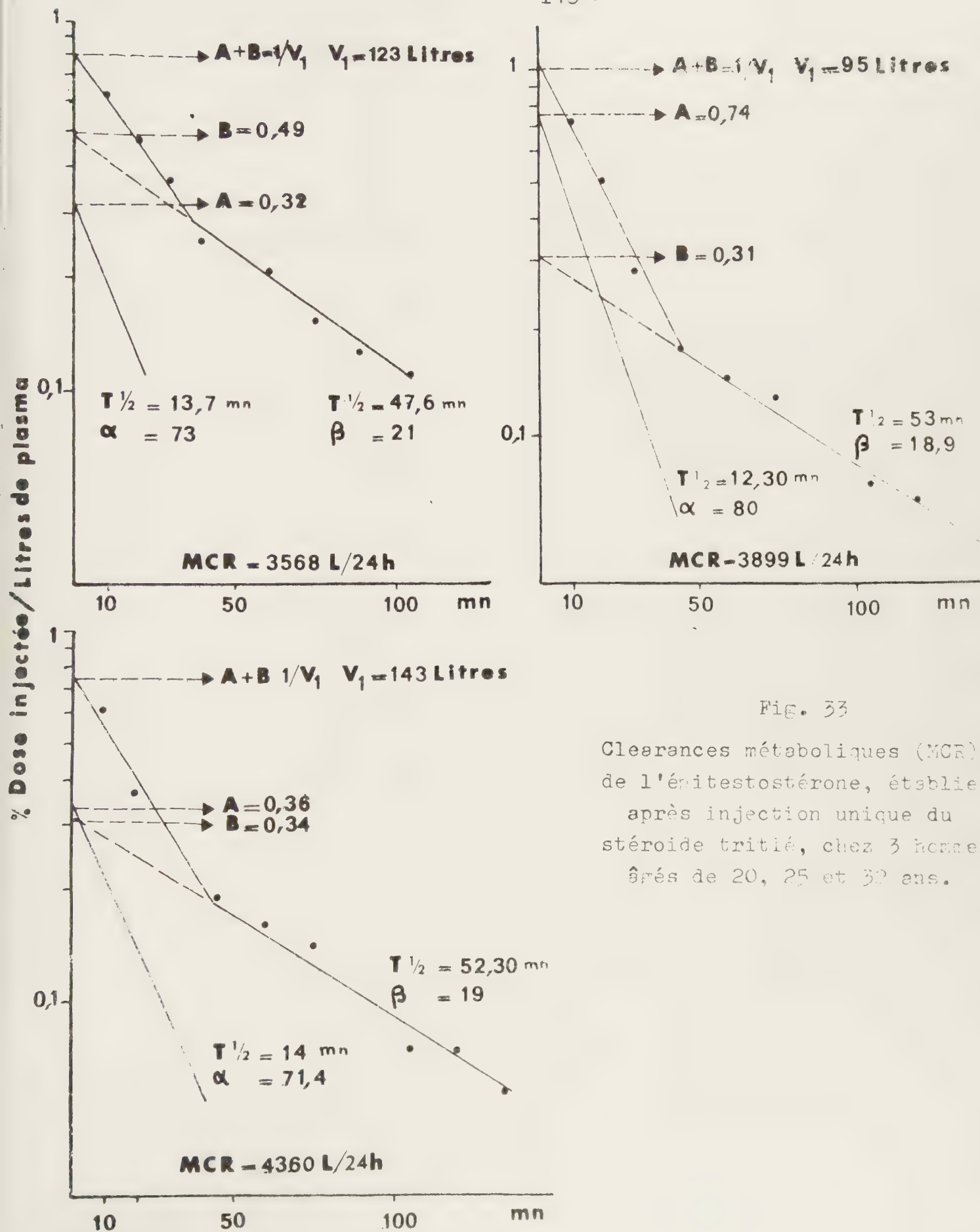


Fig. 33

Clearances métaboliques (MCR) de l'épitéstostérone, établies après injection unique du stéroïde tritié, chez 3 hommes âgés de 20, 25 et 32 ans.

TABLEAU XXXI

MCR, exprimé en L/24 h et en L/24h/m² de surface corporelle après injection unique et index de liaison stéroïde/proteines sériques chez l'homme adulte sain, de divers stéroïdes

		MCR		Index de liaison	
		L/24 h	L/24h/m ²	(I/P)	(ΔI/P)
T		1 628	946,5	0,83	0,50
EpiT	1	4 360	2 691	0,40	0,10
	2	3 899	1 999	0,43	0,07
	3	3 568	2 287	0,43	0,05
ST		43,7	25,4	4,96	2,70
S EpiT	1	121,7	78	1,36	0,46
	2	173	98,8	-	-
S DHA			16 à 32	2,00	0,10

D - TAUX DE PRODUCTION DE T, EPIT
(LIBRES ET SULFATES)

Principe.

Chez l'Homme nous disposons d'une méthode plasmatique et d'une méthode urinaire.

Dans la méthode plasmatique, le taux de production est obtenu à partir des équations précédentes 1 ou 3, suivant le protocole choisi (perfusion à débit constant ou injection unique). Connaissant le MCR, il suffit de mesurer la concentration plasmatique du stéroïde avant le début de la perfusion pour obtenir la valeur de la production.

Dans la méthode urinaire, après administration du stéroïde tritié par voie veineuse, on recueille les urines pendant un temps suffisant pour que la presque totalité de la radioactivité du métabolite choisi soit éliminée. La valeur de la production est donnée par la formule :

$$P = \frac{R^{\text{X}}}{As \times T}$$

P : exprimé en mg/24 h,

R^X : radioactivité injectée,

T : durée du recueil des urines exprimée en jours,

As : activité spécifique du métabolite choisi

Résultats.

1 - Production de la testostérone.

Chez l'homme, il a été montré que le glucuronide de testostérone urinaire provient essentiellement de la testostérone circulante (184, 185, 186). Nous l'avons donc considéré comme métabolite spécifique pour mesurer, dans deux cas (HAMI. et FERR.), la production de la testostérone par la méthode urinaire ; dans deux autres cas (ACHA. et BOUB.), nous avons établi la production de la testostérone par la méthode plasmatique après perfusion continue de testostérone tritiée (tableau XXXII). Il est remarquable de constater que les valeurs de production de la testostérone sont plus élevées par la méthode plasmatique que par la méthode urinaire. Ceci ne nous étonne pas, étant donné les variations circadiennes non négligeables du taux de la testostérone plasmatique que nous avons montré chez l'homme adulte (voir chapitre suivant) : la concentration étant maximale dans la matinée, au moment de la réalisation du MCR, le calcul de la production, établi pendant cette période et rapporté à 24 h, donne une estimation fautive par excès. L'importance de l'erreur varie d'un sujet à l'autre ; dans certains cas, nous avons constaté des différences de concentration supérieures à 50 % entre les chiffres du matin et ceux du soir.

2 - Calcul de la concentration de l'EpiT plasmatique.

Nous avons vu que la méthode de dosage par double dilution isotopique que nous avons mise au point ne nous

a pas permis d'apprécier le taux de l'épitestostérone libre du plasma : nous avons pu seulement constater que ce taux devait être inférieur ou égal à 30 ng/100 ml de plasma.

Cependant nous disposons d'une approche indirecte : en effet, connaissant la valeur du MCR et celle de la production par la méthode urinaire (basée sur la mesure de l'activité spécifique du glucuronide d'épitestostérone urinaire), nous pouvons facilement calculer la concentration plasmatique qui est égale au rapport de la production en mg/24 h par le MCR en L/24 h. Nous l'avons établi chez 3 hommes adultes normaux dont la valeur du MCR a été déjà indiquée (Fig. 33 et tableau XXXI). Les productions d'EpiT étaient (dans l'ordre 1,2,3 du tableau) 0,58 - 0,74 et 0,42 mg/24 h ; les concentrations plasmatiques d'EpiT correspondantes (production en mg, par 24 h/MCR en litres par 24 h), étaient :

14 - 17 - 12 ng/100 ml de plasma.

3 - Nous avons vu que les deux principaux métabolites urinaires de l'épitestostérone tritiée sont le glucuronide et le sulfate d'EpiT. On pouvait admettre que ces deux métabolites sont spécifiques de l'épitestostérone et le fait d'établir le taux de production urinaire à partir de l'un ou de l'autre de ces composés, devait conduire au même résultat. C'est ce que nous avons voulu vérifier dans 5 expériences. Le rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ du tableau XXXIII obtenu à partir du glucuronide et du sulfate dans les deux dérivés formés (acétate et benzhydrazone) indique que l'épitestostérone circulante n'est pas le seul précurseur du sulfate

d'EpiT urinaire. Le calcul de la production de l'EpiT montre une valeur plus grande (x 8) à partir du sulfate qu'à partir du glucuronide (tableau XXXII). C'est la première démonstration d'une production de sulfate d'épi-testostérone chez l'homme normal ne provenant pas de l'EpiT circulante.

TABLEAU XXXII

Taux de production de la testostérone établi chez l'homme adulte normal par la méthode plasmatique (ACHA. et BOUB.) et par la méthode urinaire (HAMI. et FERR.). Taux de production de l'épitestostérone établi par la méthode urinaire à partir du glucuronide et du sulfate d'épitestostérone chez 5 hommes adultes normaux.

Sujets	Age	Taux de production (mg/24h)		
		Testostérone	Epitestostérone	
			G-EpiT	S-EpiT
ACHA.	44	9,90		
BOUB.	33	13,40		
HAMI.	20	7,50	0,36	4,90
FERR.	25	5,00	0,41	2,10
TOUA.	20		0,40	2,00
BELK..	25		0,10	2,10
DIAM.	20		0,35	1,75
Moyenne			0,32	2,57
± 1 DS			0,14	1,45

TABLEAU XXXIII

Rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ de l'acétate et de la phénylhydrazone de l'acétate d'EpiT provenant soit de la fraction glycuronide (G-EpiT), soit de la fraction sulfate (S-EpiT).

	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$	Acétate d'EpiT	Phénylhydrazone d'acétate d'EpiT
HAMI.	G-EpiT	26,50	25,90
	S-EpiT	1,70	1,77
FERR.	G-EpiT	11,00	11,80
	S-EpiT	2,24	2,26
TOUA.	G-EpiT	18,80	18,00
	S-EpiT	3,20	3,40
BELK.	G-EpiT	36,80	35,40
	S-EpiT	1,70	1,60

E - EPREUVES DYNAMIQUES

Le problème du site de formation et celui des pré-curseurs immédiats se pose pour l'épitestostérone mais également pour le sulfate d'épitestostérone dont la production est en moyenne 5 à 10 fois plus importante chez l'homme. Nous avons montré que l'EpiT ne provenait pas du métabolisme périphérique de T et Δ , dans les conditions normales chez l'homme adulte. Est-ce un produit d'origine glandulaire, ou un métabolite d'un précurseur inconnu ?

D'autre part, comment situer la place du sulfate d'EpiT dans le schéma métabolique de l'EpiT ? Nous ne pouvons répondre pour l'instant à ces questions. Nous avons espéré obtenir quelques informations grâce aux épreuves de stimulation par l'ACTH ou par l'hormone gonadotrope chorionique. Le tableau XXXIV montre les résultats obtenus chez l'homme normal et la difficulté de leur interprétation. Tout d'abord remarquons la baisse significative de la testostérone plasmatique que nous retrouvons constamment, confirmant ainsi les résultats de Riverola et al. (187). Alors que le taux du sulfate de testostérone n'est pas modifié sous ACTH, il semble que celui du sulfate d'épitestostérone diminue. Nous constatons l'inverse sous HCG ; baisse de ST et pas de modification de S-EpiT. Retenons que l'expérience sous HCG montre à l'évidence, que le taux de la testostérone libre est doublé, alors qu'il n'y a pas d'augmentation du ST, ni du S-EpiT : de ce fait il ne semble pas que les testicules de l'homme normal participent d'une manière importante à la production de sulfate de testostérone ou d'épitestostérone.

TABLEAU XXXIV

Epreuves dynamiques après injection intramusculaire de (2x40)U. de cortrophine retard à 8 h d'intervalle (Obs.I, homme de 26 ans) et de HCG (4x5000 U/jour)(Obs.2, homme de 25 ans). Les concentrations de la testostérone, du sulfate de testostérone et du sulfate d'épitestostérone sont exprimées en $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ de plasma. Les valeurs respectives du témoin aqueux sont indiquées entre parenthèse en $\mu\text{g}/100\text{ ml}$.

	T (0,044)	S-T (0,030)	S-EpiT (0,040)
<u>Observation I</u>			
Base	0,536	0,164	0,825
ACTH 1er j.	0,481	0,180	0,634
2ème j.	0,388	0,144	0,525
3ème j.	0,348	0,168	-
<u>Observation II</u>			
Base	0,535	0,226	0,523
HCG 3ème j.	-	0,128	0,530
4ème j.	1,101	0,154	0,582

CHAPITRE V

ETUDE DU RYTHME CIRCADIEN DE LA TESTOSTERONE

INTRODUCTION

Bien que les rythmes biologiques les plus évidents soient connus depuis fort longtemps, l'étude de leurs mécanismes connaît un intérêt croissant depuis une vingtaine d'années, comme le montre le contenu de 4 revues importantes concernant les rythmes dans différents organismes, plantes et animaux : celle de Kleitman publiée en 1949 (188), celle d'Aschoff en 1958 (189) et celles de Bünning (190) et de Reinberg et al. (191) en 1964. Les rythmes circadiens sont les plus étudiés à l'heure actuelle, en particulier chez l'Homme. En 1842, Gierse (192) décrit la variation circadienne de la température du corps ; en fait, c'est à Chossat (193) que l'on doit, en 1843, les premières informations expérimentales valables concernant les rythmes circadiens : il a montré la persistance du rythme circadien de la température cloacale chez le Pigeon, privé, jusqu'à la mort, de nourriture et de boisson. Le développement des moyens techniques de détection et de mesure va permettre

l'identification et la description d'un très grand nombre de rythmes circadiens : citons celui de l'activité mitotique dans différents tissus (194), celui du taux des eosinophiles circulants (195), celui des électrolytes urinaires (196) etc... Nombreuses sont les revues concernant les rythmes circadiens en général (197 - 200), les rythmes circadiens chez l'Homme (201, 202, 203).

1 - Définition des rythmes circadiens.

C'est un rythme biologique ou physiologique dont la période τ , est d'environ 24 h avec pour limites 20 et 28 h. L'utilisation de ce terme, introduit par Halberg (204) tend à se généraliser. Cet auteur distingue également les rythmes ultradiens dont la période peut varier de 0,5 h à 20 h et infradiens dont la période peut varier de 28 h à 2,5 j. Ces trois rythmes représentent les rythmes de moyenne fréquence ; les rythmes dont la période est inférieure à 0,5 h sont les rythmes de haute fréquence et ceux dont la période est supérieure à 28 h sont les rythmes de basse fréquence ($\tau \approx 7$ j, $\tau \approx 30$ j, $\tau \approx 1$ an...).

2 - Composants endogènes et exogènes des rythmes circadiens.

Des nombreux travaux des botanistes (205), zoologistes et physiologistes (206, 207, 208), il ressort que les rythmes prennent origine primitivement dans l'organisme lui-même, autrement dit qu'ils font partie du patrimoine génétique de l'espèce considérée ; l'existence de tels rythmes

endogènes est maintenant amplement démontrée à tous les niveaux d'organisation, y compris les organismes cellulaires. Ces rythmes endogènes peuvent être caractérisés par différents paramètres. Bien qu'endogènes, ces biorythmes sont influencés par les variations -périodiques elles aussi- des synchroniseurs de l'ambiance. Les organismes vivant à la surface du globe sont, en général, soumis à l'influence de facteurs ou d'agents qui varient de façon cyclique : variations lumineuses entre le jour et la nuit ou d'une saison à l'autre, variations thermiques, variations de la nature et de l'intensité des bruits etc... Pour les rythmes circadiens, la période du synchroniseur est habituellement de 24 h en moyenne. Chacun de ces facteurs externes peut être considéré comme un synchroniseur dans la mesure où il est capable d'imposer sa période et sa phase aux rythmes biologiques d'un organisme sensible. Chez les Rongeurs, par exemple, l'alternance lumière/obscurité est, habituellement un des synchroniseurs les plus puissants ; chez l'Homme, ce sont les impératifs horaires liés à la vie sociale qui semblent avoir une action synchronisatrice circadienne prépondérante. La suppression de certains synchroniseurs (séjour dans des grottes sans information temporelle par exemple) ou leur changement de phase (vols transmériidiens à longue distance, travail de nuit, par exemple) peut affecter la période, l'amplitude et la phase des biorythmes.

En résumé, s'ils ne créent pas les rythmes, les synchroniseurs sont capables de modifier les valeurs de certains de leurs paramètres.

3 - Caractère inné des rythmes circadiens.

L'apparition de certains rythmes chez les nouveau-nés de diverses espèces animales, le rythme circadien de l'éclosion des Drosophiles par Pittendrigh (200), le rythme de l'activité spontanée du Poulet par Aschoff (209) sont des exemples expérimentaux qui conduisent à rejeter l'hypothèse de l'acquisition des rythmes biologiques par chaque individu, à chaque génération, et à admettre que les rythmes biologiques font partie des caractères héréditaires de chaque espèce (200). Les observations faites chez le nouveau-né et le nourrisson humains par Kleitman et al. (210), par Hellbrügge et al. (211) et par Halberg (212) conduisent aux mêmes conclusions. Hellbrügge admet que les "rythmes circadiens du nourrisson sont innés, que leur période spontanée n'est pas de 24 h et qu'il faut attendre des délais variables de maturation pour que les synchroniseurs habituels deviennent efficaces et confèrent à la période des diverses fonctions étudiées, une durée d'exactly 24 h".

4 - Rythmes circadiens et sécrétions des stéroïdes chez l'Homme.

17 OH CS : En 1943, les techniques de dosage des stéroïdes étaient peu développées et la fonction surrénalienne était appréciée par la mesure des 17 céto-stéroïdes urinaires. C'est ce test peu spécifique que Pincus a utilisé pour montrer, à cette époque, l'existence chez les hommes adultes, d'une baisse nocturne et d'une élévation diurne de l'excrétion urinaire des 17 CS (213) : il rendait responsable

de cette élévation, le stress de l'activité diurne. Par la suite, la possibilité de mesurer les métabolites tétra-hydrogénés du cortisol par la réaction de Porter et Silber, a permis de mettre en évidence un rythme circadien des 17-hydroxy-corticostéroïdes urinaires (214, 216), lequel est le reflet, avec une différence de phase, d'un rythme circadien des 17 OH CS plasmatiques (217, 220). La possibilité de mesurer des concentrations faibles de stéroïdes dans le plasma (notamment par double dilution isotopique) a permis une approche biochimique plus rigoureuse et plus spécifique de l'étude des rythmes : c'est ainsi que Peterson (221) a montré l'existence d'une variation circadienne du cortisol et de la corticostérone chez l'Homme et plus récemment Gordon et al. (222) ont montré l'existence d'un rythme circadien du tétrahydro-cortisol et de la tétrahydro-corticostérone. De toutes ces études, il apparaît que, chez l'Homme, la sécrétion du cortisol et de la corticostérone par le cortex surrénal présente un maximum durant les dernières heures de sommeil et un minimum tard dans la soirée. Le taux plasmatique du cortisol et de la corticostérone d'une part, celui de leurs métabolites tétra-hydrogénés d'autre part, suivent le même profil au cours des 24 h : l'acrophase (heure du pic) plasmatique précédant l'acrophase urinaire (222).

L'origine d'un rythme du cortisol plasmatique a fait l'objet de nombreuses études orientées dans deux directions principales :

- l'une à la recherche d'une modification temporelle de la consommation du cortisol par les tissus. Chez le sujet normal, il ne semble pas, d'après Perkoff et al. (223) exister une telle variation. Un argument tiré de la pathologie irait dans le même sens : dans l'hyperthyroïdie non traitée, affection au cours de laquelle la $1/2$ vie du cortisol est accélérée (224), le rythme circadien du cortisol ne semble pas modifié (223). La même absence de modification du rythme a été observée dans la cirrhose du foie (224), affection qui est réputée entraîner un ralentissement de la $1/2$ vie du cortisol (225). Cependant Tuci et al. (226) constatent sur 4 des 8 cirrhoses étudiées, soit un étalement du pic, soit une diminution notable de l'amplitude du cycle du cortisol. Ces auteurs envisagent une régulation hépatique de la sécrétion hypophysaire de l'ACTH par le mécanisme de feed-back : une altération progressive de la dégradation hépatique du cortisol pourrait conduire à une réduction de l'amplitude du rythme du cortisol, une diminution de la sécrétion de l'ACTH, et une baisse de la production du cortisol,

- l'autre direction, à la recherche d'un rythme circadien de l'ACTH plasmatique. Ce rythme a été envisagé à la suite des expériences de Nugent et al. (227), la perfusion à débit constant de l'ACTH pendant 4 jours entraînant la disparition du rythme du cortisol, celles de Gold et al. (228), de Martin et al. (229), la perfusion à débit constant de la métyrapone (SU 4885) entraînant une excrétion urinaire des 17 OH CS maximale de 04 h à 08 h. L'utilisation de

l'action de l'ACTH sur la stéroïdogénèse par le test de Lipscomb et Nelson (230) a permis à Ney et al. (231) et à Binoux et al. (232) de montrer l'existence de ce rythme. Il a été confirmé par Demura et al. (233) avec une méthode radioimmunologique (234). Les uns considèrent qu'il existe un parallélisme étroit entre les rythmes de l'ACTH et du cortisol plasmatiques (231, 233), les autres constatent un décalage de phase : l'élévation de l'ACTH serait plus précoce, plus lente, plus prolongée que celle du cortisol et la baisse plus brutale. Le parallélisme entre les deux courbes ferait donc défaut pendant cette partie de la journée (232). Qu'il y ait ou non décalage de phase, on peut concevoir entre les deux rythmes deux ordres de relation :

- la sécrétion de l'ACTH serait commandée par la baisse du cortisol libre circulant. Cependant les arguments qui plaident en faveur d'un rétro-contrôle de l'ACTH sont tous tirés de situations extraphysiologiques (235, 236, 237) et ne prouvent pas que le feed-back intervienne dans les conditions habituelles.

- la sécrétion circadienne de l'ACTH serait responsable de la fluctuation de la cortisolémie. Les arguments sont nombreux et convaincants : abolition des rythmes de l'ACTH et du cortisol dans les désordres du système nerveux central (238, 239, 240) ou sous l'effet de dépresseurs de ce système, comme la morphine (241), élévation des 17 OH CS urinaires variable selon le moment où se situe la perfusion de métyrapone (235), enfin persistance du cycle

de l'ACTH (236) chez des sujets ayant une cortisolémie constamment basse (addisoniens traités temporairement avec des doses faibles de cortisol). La variation circadienne de la sécrétion ou de la libération d'ACTH serait elle même en partie, le résultat d'une variation circadienne de l'activité des centres neurorégulateurs (242, 243). La mise en jeu du "feed back" cortisol/ACTH n'interviendrait que dans des conditions physiologiques inhabituelles ou pathologiques. Rappelons que chez la Souris, Halberg et al. (244) ont mis en évidence les rythmes circadiens suivants : contenu de l'hypothalamus en CRF, contenu de l'antéhypophyse en ACTH, capacité de réponse de la surrénale à l'ACTH, corticostérone plasmatique, nombre des éosinophiles circulants etc... Ce système circadien peut parfaitement fonctionner sans faire intervenir de feed-back. Rappelons que cette notion de feed-back ne comporte pas d'information temporelle.

Quelle est la signification des variations cycliques de l'ACTH et du cortisol plasmatique ? Elle n'est pas connue à l'heure actuelle. Notons cependant que le rythme circadien du cortisol plasmatique et des 17 OH CS urinaires persiste en l'absence des synchroniseurs connus, activité et lumière (245, 246).

Aldostérone : l'excrétion urinaire de l'aldostérone (18-glucuronide) varie d'une manière circadienne (247, 248, 249) ; des facteurs orthostatiques (250, 251) qui interviendraient par l'intermédiaire des modifications de la sécrétion de rénine (252, 253, 254) peuvent agir sur ce rythme. Il ne sont pas indispensables cependant car ce rythme persiste au repos complet au lit (Bartter et al. communication personnelle).

Androgènes : là encore, la qualité des informations a été fonction des progrès techniques. L'utilisation de procédés chromatographiques a permis à Migeon et al. en 1957 de mesurer séparément, après hydrolyse acide, la déhydroépiandrostérone et l'androstérone et de montrer l'existence d'une variation circadienne de ces deux androgènes dans le plasma des sujets adultes normaux : valeur élevée le matin et diminution au cours de la journée (255). Cette variation est, d'après ces auteurs, comparable, bien que de plus faible amplitude, à celle observée pour le taux plasmatique des 17 OH CS. Une variation circadienne de déhydroépiandrostérone plasmatique (mesurée par la réaction d'Allen, après hydrolyse acide et chromatographie sur papier) a été également retrouvée par Eik-Nes et al. (256) et Fortherby (257). Mc Donald et al. (258), par la méthode isotopique urinaire de détermination de la production hormonale, ont montré l'existence d'une variation circadienne de la sécrétion de la déhydroépiandrostérone. Mc Kenna et al. (259) utilisant une méthode plus spécifique pour extraire les sulfates de stéroïde (sous forme de sels de pyridinium) ont montré chez l'homme adulte, une variation circadienne du sulfate de déhydroépiandrostérone plasmatique : le maximum de concentration correspondant au maximum d'activité ; ces derniers résultats sont donc en contradiction avec ceux de Migeon (255). Récemment Lestikainen et al. (260) ont étudié, par chromatographie gazeuse, les fluctuations au cours des 24 h, des concentrations plasmatiques des différents mono et disulfates de stéroïde chez six hommes normaux ayant conservé leurs activités habituelles. Ils ont observé notamment une variation circadienne dans les concentrations plasmatiques du sulfate de déhydroépiandrostérone et du sulfate d'androstérone. Les valeurs sont plus élevées à 12 h et à 16 h,

de 15 à 30 % supérieures aux valeurs observées à 0 h ou à 08 h. Ces fluctuations diffèrent donc de celles constatées pour les 17 OH CS plasmatiques. Pour ces auteurs, la différence dans les variations circadiennes des 17 OH CS libres et des stéroïdes neutres sulfo-conjugués pourrait refléter des différences dans la libération de ces deux types de composés par les surrénales : une réserve importante est à faire concernant leurs conclusions, car le mode de synchronisation des sujets n'a pas été précisé.

5 - Conditions d'étude et analyse d'un rythme circadien.

Un rythme existe dans le déroulement d'un processus biologique lorsqu'on constate une variation périodique régulière et prévisible de l'index biochimique ou autre, qui permet de le caractériser.

- Habituellement, on se contente de reporter, en fonction du temps, les valeurs expérimentales obtenues, afin d'en réaliser une représentation graphique. Cette méthode ne permet qu'une analyse "macroscopique" et surtout laisse une indétermination importante quand à la phase (minimum et maximum de la variation), à l'amplitude et à la période du processus.

- Si l'on assimile un biorythme à une fonction périodique, sinusoidale (ce qui est possible par la méthode des moindres carrés), on peut en avoir une représentation objective en déterminant, avec les indices de dispersion statistiques correspondants, la période τ , l'amplitude C , la phase φ (localisation du sommet de la fonction étudiée ou acrophase). Un programme de calcul statistique électro-

nique appelé cosinor (261) permet, à partir de données expérimentales convenables, de détecter un rythme, d'en déterminer l'amplitude, la période et l'acrophase. Les résultats sont représentés en coordonnées polaires planes en donnant à la période prédominante τ la valeur de 360°C. Sur chaque série d'un échantillon transversal, on estime les valeurs de C et de φ et leurs limites de confiance pour une sécurité de 95 % par exemple. Le calculateur dessine lui-même l'ellipse représentant la région de confiance de valeurs pondérées de φ et de C . Les axes de cette ellipse d'erreur sont proportionnels respectivement à l'intervalle de confiance des valeurs obtenues pour φ et C . Le vecteur qui joint l'origine des coordonnées au centre de l'ellipse fournit par sa longueur une estimation de l'amplitude. La surface de l'ellipse d'erreur dépend de la dispersion des φ et des C du rythme analysé à partir des données expérimentales et du degré de sécurité statistique désiré. Si l'ellipse ne recouvre pas le pôle (origine des coordonnées), le rythme est détecté dans les limites statistiques choisies (Fig. 34).

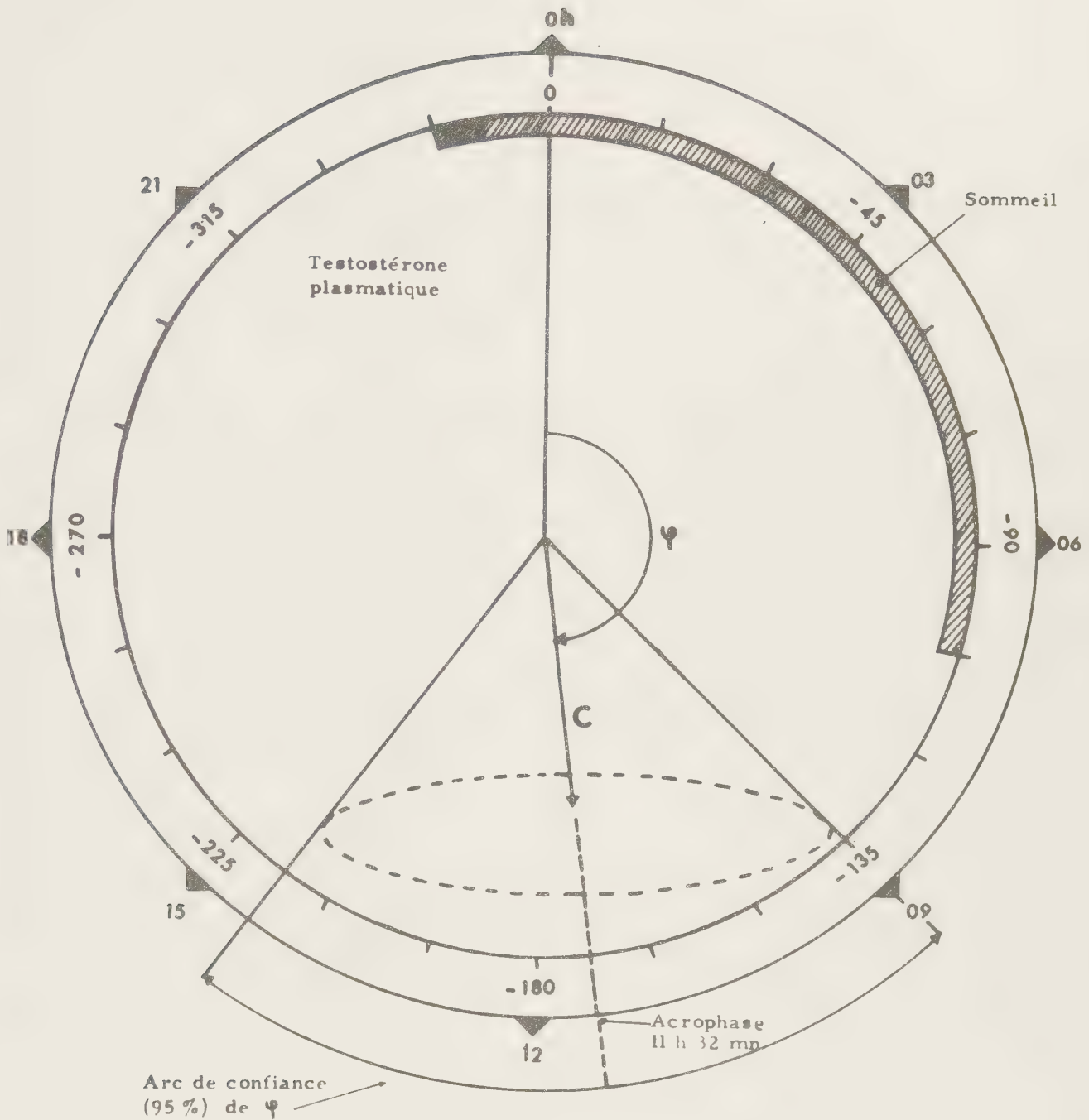


Fig. 34

Représentation en coordonnées polaires planes des résultats fournis par la méthode du cosinor. Estimation de l'angle de phase ψ et de l'amplitude C. L'ellipse d'erreur permet de faire apparaître les limites de confiance de ces 2 paramètres pour la sécurité choisie.

RESULTATS PERSONNELS

A - Existence d'un rythme circadien de la testostérone plasmatique chez l'homme adulte.

1 - Choix des sujets.

Deux études ont été réalisées, la première au cours du premier trimestre 1965 et la deuxième étude en Mars 1969. Dans tous les cas, les explorations ont été réalisées chez des hommes adultes jeunes ayant conservé leur mode de vie habituel : même genre d'activité professionnelle, même rythme de vie et même habitudes alimentaires. D'une manière systématique, les sujets qui avaient présenté un épisode fébrile ou qui avaient pris une médication quelconque dans les deux semaines précédant l'épreuve, ont été exclus de l'étude.

2 - Matériel.

Le sang (≈ 25 ml) a été recueilli sur héparine, centrifugé dans un délai de 30 mn au maximum et le plasma décanté immédiatement après et conservé à -20°C jusqu'au dosage par double dilution isotopique suivant le protocole déjà décrit. Lors de la deuxième étude, un supplément de 10 ml de sang a été prélevé pour y mesurer l'affinité de liaison (1/P) de la testostérone selon un protocole décrit au chapitre suivant.

3 - Résultats.

a - Première étude, réalisée en Janvier et Février 1965.

Elle a concerné 5 hommes âgés de 20 à 42 ans, qui se couchaient habituellement vers 23 h et se levaient vers 07 h, en particulier pendant les 3 semaines précédant l'épreuve ; leurs repas étaient pris à 12 h et 20 h. Le jour de l'épreuve, les sujets ont attendu le prélèvement de 01 h pour se coucher. Les prélèvements ont été effectués toutes les 6 heures pendant 24 heures. Le tableau XXXV indique les valeurs de la testostérone plasmatique obtenues pour chaque sujet : l'existence d'un rythme circadien de la testostérone est manifeste. Les figures 34 et 35 montrent l'exploitation graphique des résultats selon la méthode classique (moyenne $\pm$ une déviation standard) et selon la méthode du cosinor. La figure 35 montre que les valeurs obtenues à 07 h et (ou) 13 h sont significativement plus élevées ($p < 0,01$) que celles obtenues à 19 h et (ou) 01 h. La baisse maximale est de 33 %. L'analyse par la méthode du cosinor donne une autre confirmation de l'existence de ce rythme (l'ellipse d'erreur, pour une sécurité de 95 % ne recouvrant pas le pôle) ; l'amplitude C du rythme est de 0,11 (0,04 - 0,18). L'angle de phase ψ du sommet ou acrophase est de -128°C (-61 à 210°C), (l'origine étant le milieu de l'espace quotidien d'obscurité) ; exprimé en heure, il correspond (si l'on prend 0 h pour origine) à 11 h 32 mn. Les intervalles de confiance sont indiqués pour 95 % de sécurité.

b - Deuxième étude, réalisée en Mars 1969.

Elle a concerné un groupe homogène de 12 étudiants en médecine âgés de 19 à 23 ans (couchés à 24 h et levés à 07 h). Dans chaque cas, deux dosages ont été effectués, l'un dans la matinée, entre 10 et 11 h, l'autre entre 22 et 23 h. Sur chaque prélèvement de sang, la testostérone plasmatique et l'affinité de liaison (1/P) de la testostérone ont été mesurées.

α - Testostérone plasmatique : la même chute nocturne ($p < 0,01$) a été retrouvée - $0,57 \pm 0,10$ $\mu\text{g}/100$ ml le matin contre $0,36 \pm 0,09$ $\mu\text{g}/100$ ml le soir. La baisse est de 36 %.

β - Affinité de liaison de la testostérone : le tableau XXXVI montre les valeurs respectives de la testostérone plasmatique et de l'affinité de liaison (1/P) obtenues dans chaque cas. On ne constate pas de différence significative ($p > 0,3$) dans la moyenne de (1/P) entre les échantillons du matin et ceux du soir : $0,80 \pm 0,10$ (DS) L/g le matin et $0,76 \pm 0,13$ (DS) L/g le soir. Si l'on se reporte à la figure 36 on constate, dans certains cas, des variations de l'affinité de liaison mais sans rapport avec celles de la testostérone. En effet, dans le cas n° 1 alors que la baisse du taux de la testostérone est la plus importante de celles enregistrées, l'affinité de liaison ne varie pas ; dans les cas n° 6 et 11 la baisse du taux

de la testostérone est d'importance égale, mais l'affinité chute nettement dans le cas n° 6 et augmente d'une manière aussi nette dans le cas n° 11. Sur les 12 cas étudiés, 3 d'entre eux ont une affinité identique à 11 h et 23 h, 5 autres ont une affinité plus faible à 23 h (la chute la plus importante étant de 23 %) et les 4 dernières ont une affinité plus forte à 23 h (l'élévation la plus importante étant de 16 %). Si l'on tient compte des variations pouvant atteindre 15 % d'un jour à l'autre chez le même sujet à la même heure, on ne peut attacher une importance significative aux variations de l'affinité de liaison de la testostérone chez le même sujet entre le prélèvement du matin et celui du soir.

B - La testostérone plasmatique chez la femme, au cours des 24 h.

Etant donné les plus faible taux de testostérone plasmatique chez la femme normalement réglée ($\approx 0,050$ $\mu\text{g}/100$ ml) et la sensibilité de la méthode de dosage utilisée, nous avons préféré étudier les éventuelles fluctuations de la testostérone plasmatique chez la femme à partir d'un pool de plasma. Deux expériences ont été réalisées chez des étudiantes et enseignantes du même établissement (prise de sang toutes les 6 h pendant 24 h.).

1 - Expérience A : elle a concerné 5 femmes, âgées de 18 à 25 ans. Le prélèvement a été effectué dans la première partie du cycle. Le même volume plasmatique a été prélevé sur chaque échantillon et les échantillons, recueillis à la même heure, ont été réunis. Chaque dosage a été fait à partir d'un volume de 45 ml de plasma.

2 - Expérience B : même protocole s'adressant à 4 femmes âgées de 25 à 29 ans (personnel du laboratoire). Le dosage de la testostérone a été effectué sur un volume plasmatique de 36 ml.

Le tableau XXXVII montre les résultats des deux expériences. L'analyse statistique classique et le test de cosinor de nos résultats expérimentaux n'ont pas montré de variation circadienne de la testostérone plasmatique chez la femme.

C - Existence d'un rythme circadien du glucuronide de testostérone urinaire, chez l'homme adulte.

Nous avons entrepris récemment une étude des variations du glucuronide de testostérone urinaire au cours des 24 h chez l'homme adulte normal. Les sujets étaient des membres du personnel du laboratoire âgés de 22 à 28 ans. Les prélèvements ont été effectués toutes les 6 h, et à la même heure pour tous les sujets.

Il existe comme l'indique le tableau XXXVIII une variation importante des valeurs du GT urinaire avec un minimum lors du prélèvement de la nuit (0 à 06 h). Une étude plus serrée (toutes les 3 h) pourrait situer ce rythme par rapport à celui de la testostérone plasmatique.

TABEAU XXXV

Variation de la testostérone plasmatique en µg/100 ml chez 5 hommes adultes normaux.

Heures de prélèvement		13 h	19 h	01 h	07 h	13 h
Sujet I	42 ans	0,688	0,667	0,512	0,682	0,725
Sujet II	20 ans		0,786	0,457	0,679	0,742
Sujet III	25 ans		0,610	0,505	0,840	
Sujet IV	32 ans	0,813	0,643	0,800	0,833	
Sujet V	20 ans	0,835	0,680	0,610	0,930	0,830
Moyenne		0,779	0,577	0,521	0,786	0,765
± 1 DS		0,047 (n=3)	0,029 (n=5)	0,033 (n=5)	0,049 (n=5)	0,034 (n=4)
Diminution en % par rapport à la valeur maximum de 07 h		0,86	26	33	0	2,6

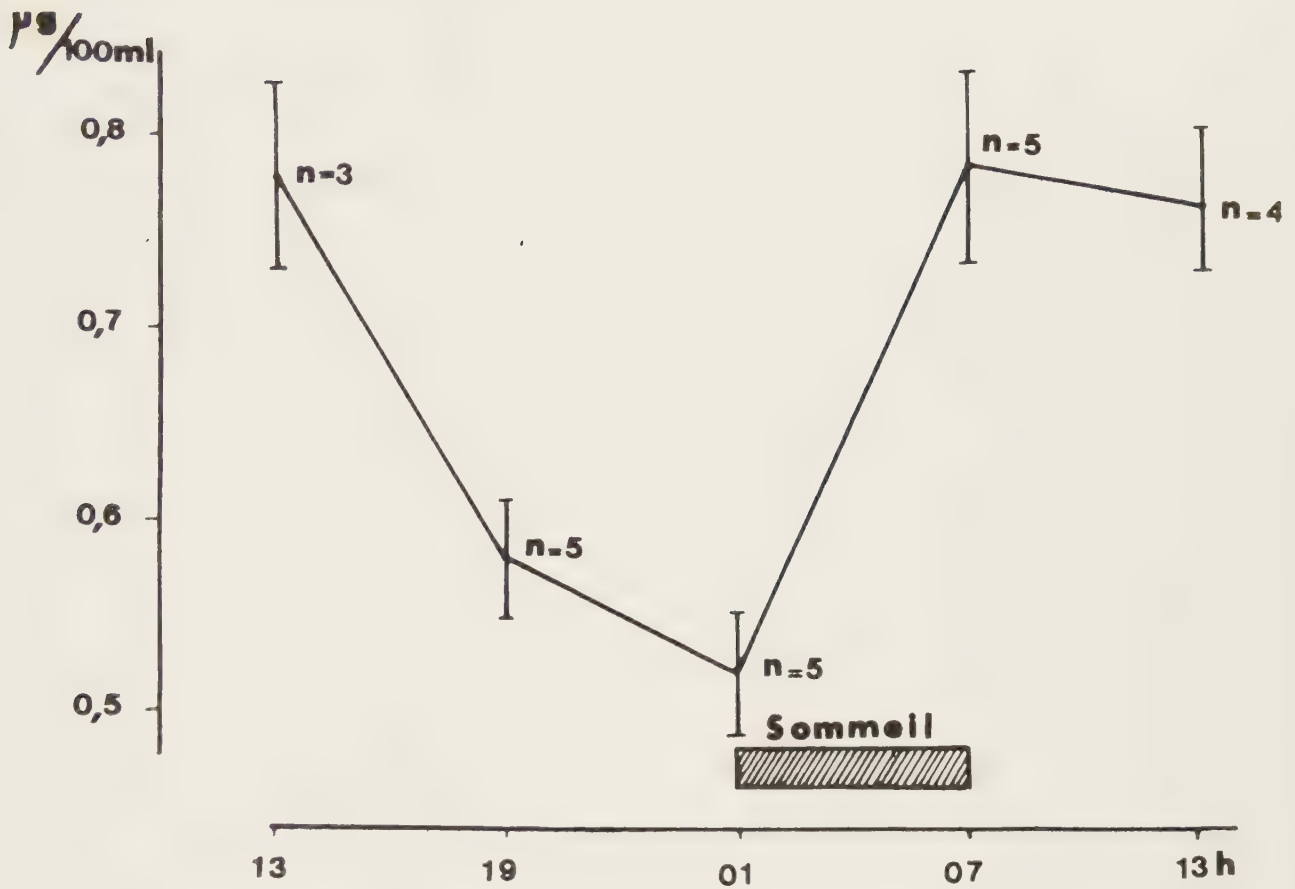


Fig. 35

Variation circadienne de la testostérone plasmatique
en $\mu\text{g}/100\text{ ml}$: moyenne $\pm$ une déviation standard.
(n = nombre de cas étudiés).

TABLEAU XXXVI

Testostérone plasmatique (TE) en $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ et affinité de liaison de la testostérone $(1/P)_T$ en L/g le matin et le soir chez 12 hommes adultes normaux.

Sujets	Ages	T P		$(1/P)_T$	
		I	II	I	II
1 PIA.	21	0,677	0,163	0,93	0,94
2 MAG.	23	0,632	0,318	0,78	0,60
3 GRO.	21	0,482	0,410	0,74	0,81
4 GER.	20	0,540	0,379	0,89	0,87
5 MIC.	22	0,452	0,320	0,80	0,67
6 SAA	19	0,674	0,396	0,95	0,73
7 BOU.	19	0,430	0,215	0,79	0,66
8 MON.	22	0,506	0,385	0,88	0,96
9 VIN.	20	0,706	0,383	0,70	0,65
10 ARV.	22	0,495	0,414	0,58	0,60
11 GUE.	23	0,527	0,392	0,77	0,92
12 CHA.	21	0,680	0,500	0,78	0,66
Moyenne		0,570	0,360	0,80	0,76
$\pm 1\text{ DS}$		0,100	0,090	0,10	0,13
		$p < 0,01$		$p > 0,3$	

I : prélèvement effectué entre 10 et 11 h

II : " entre 22 et 23 h.

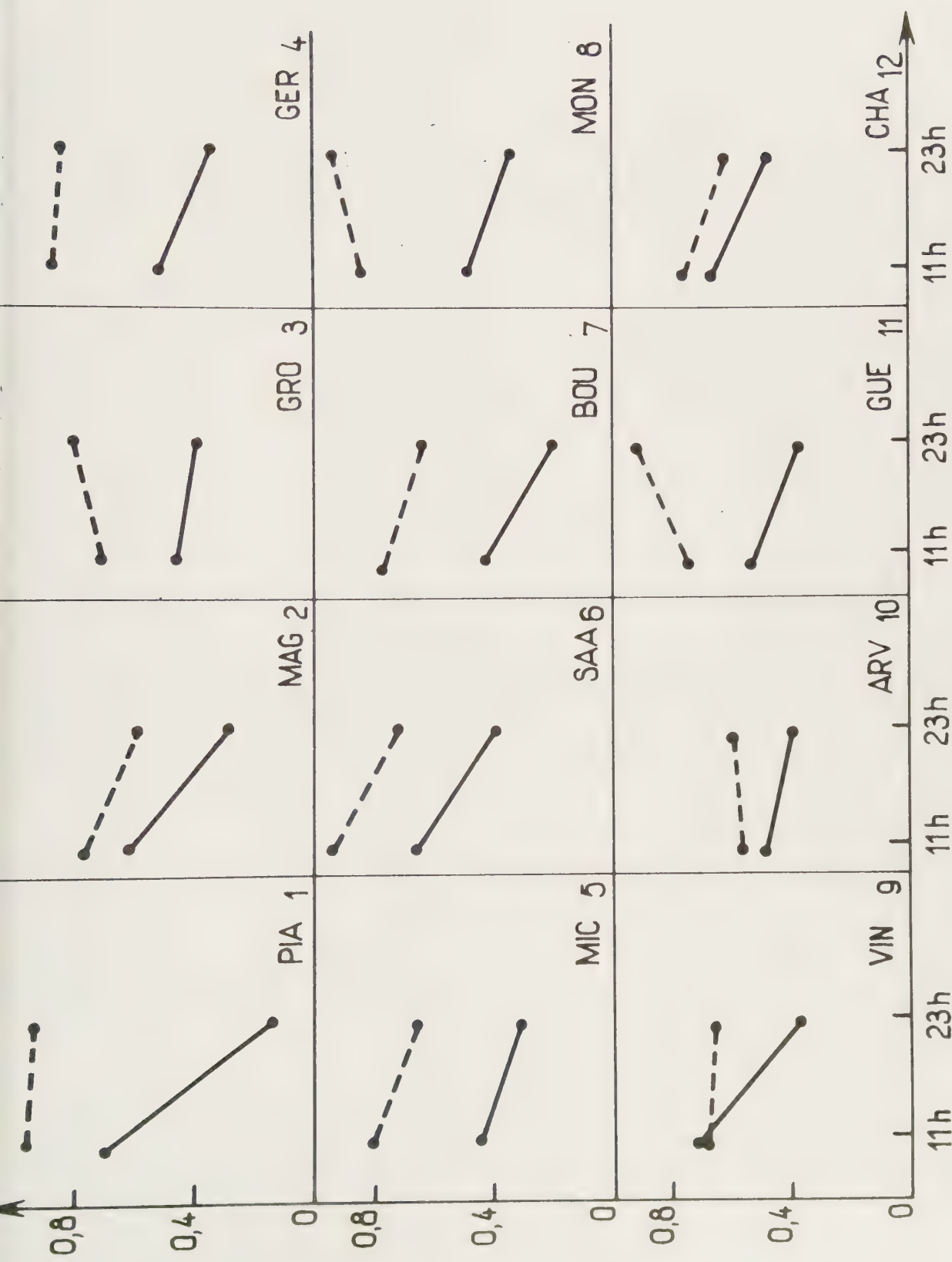


Fig. 56

Valours de la testostérone plasmatique (ug/100 ml) et de l'affinité de liaison (L/P) de la testostérone (L/g de protéine), obtenues chez le même sujet à 11 h et à 23 h.

L'étude a été réalisée chez 12 hommes adultes normaux.

TABLEAU XXXVII

Testostérone plasmatique (TP) en $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ au cours de 24 h
chez la femme adulte normalement réglée

TP	13 h	19 h	01 h	07 h	13 h
Pool A	0,038	0,031	0,044	0,037	0,039
Pool B	0,067	0,056	0,056	0,060	0,065

Pool A : 5 femmes âgées de 18 à 25 ans (1ère partie du cycle)

Pool B : 4 femmes âgées de 25 à 29 ans

TABLEAU XXXVIII

Etude de la variation du glucuronide de testosterone urinaire, toutes les 6 heures, sur une période de 30 heures chez trois hommes adultes normaux : CHAU. 23 ans, LAGO. 27 ans et KORV.

27 ans - Résultats exprimés en μg /échantillon d'urine.

	CHAU.	LAGO.	KORV.
12 - 18 h	29,3	21	17,6
18 - 24 h	23,3	14	19
0 - 6 h	9,6	13	14,6
6 - 12 h	59,3	16	41,6
12 - 18 h	31,6	22	20

- Discussion des résultats.

a - Existence d'un rythme circadien de la testostérone plasmatique chez l'homme adulte sain.

Depuis la note que nous avons présentée en 1965 aux Comptes Rendus (262), plusieurs auteurs ont publié des résultats concernant le biorythme de la testostérone plasmatique chez l'homme adulte normal. Tous, sauf un groupe australien, ont trouvé ou fini par trouver un rythme circadien de la testostérone. Southren et al. (263, 264) ont publié à deux reprises des résultats obtenus par la méthode de Riondel (135) montrant une chute nocturne de 36 % à 40 % de la testostérone chez des hommes adultes sains, couchés et récemment hospitalisés. Resko et al. (265) rapportent des résultats obtenus par chromatographie gazeuse portant sur deux séries d'analyses faites à un an d'intervalle : dans les deux cas, la baisse nocturne constatée est de l'ordre de 35 %. Il est vraisemblable que l'étude complète qui porte sur 20 cas a été faite chez des sujets ayant conservé leur rythme d'activité, mais cela n'est malheureusement pas précisé. Kirchner et al. (266) dans un premier temps n'observent pas de rythme. Ils le mettent en évidence ultérieurement (267) en utilisant dans les deux cas une méthode par double dilution isotopique. On remarque d'après leurs chiffres, bien qu'ils ne le précisent pas dans leur texte, une chute nocturne de 25 à 55 % selon les cas. Le groupe de Lloyd et al. de la Worcester Foundation réfute d'abord l'existence d'un rythme circadien (268), puis constate une baisse significative de la testostérone au cours d'une étude

curieusement limitée à 2 h 3/4, cette baisse était moins importante que celle observée dans le même temps après administration d'épinéphrine (269) ; enfin ce groupe reconnaît (270) l'existence d'une variation circadienne de la testostérone (chute de 23 % de 07 h à 19 h chez 3 sujets). Finalement, seul le groupe australien de Hudson et al. (271, 272, 222) n'a pas observé de rythme circadien de la testostérone. En résumé, on peut affirmer qu'excepté ces derniers, tous les auteurs qui ont étudié les fluctuations plasmatiques de la testostérone ont constaté l'existence d'un rythme circadien de cette hormone, pour peu qu'ils aient observé le minimum de règles indispensables dans l'étude des rythmes (notamment l'identité des synchroniseurs pour tous les sujets étudiés). Le rythme de la testostérone a une amplitude de l'ordre de 23 à 55 % selon les auteurs, donc importante, mais en général d'amplitude moins grande que celle du cortisol.

Cette controverse au sujet de l'existence du rythme circadien de la testostérone n'est pas unique et on la retrouve pour de nombreux composés biologiques : citons les difficultés rencontrées pour admettre le rythme circadien du calcium plasmatique et pour en situer l'acrophase (86, 273).

b - Variations de la testostérone plasmatique chez la femme.

L'étude faite à partir de deux pools plasmatiques (tableau XXXVII) n'a pas montré de variation circadienne de la testostérone. Un résultat négatif a également été

rapporté par Southren et al. (263). Ceci ne veut pas dire que ce rythme n'existe pas. Il convient en effet de noter que :

1 - la concentration de la testostérone plasmatique est faible chez la femme,

2 - l'amplitude du rythme peut être réduite,

3 - la testostérone plasmatique peut provenir chez la femme de l'ovaire, de la cortico-surrénale et de tissus périphériques. Ces origines diverses pourraient masquer l'existence d'un rythme plasmatique de faible amplitude.

c - Rythme circadien et métabolisme de la testostérone.

Une fois le rythme de la testostérone plasmatique reconnu chez l'homme adulte sain, il importait de le situer par rapport à d'autres rythmes circadiens qui sont en relation plus ou moins directe avec la testostérone : c'est-à-dire situer le rythme de la testostérone dans la structure temporelle circadienne de l'organisme. On a noté que le flux sanguin hépatique diminue jusqu'à 50 % sous l'effet de l'exercice (274). Ceci conduit Tait et Burstein (275) à suggérer que les stéroïdes, avec un MCR élevé et probablement une forte extraction hépatique, doivent être épurés moins rapidement du plasma lorsque le flux sanguin hépatique diminue. Lipsett et al. (267) dans une expérience de perfusion continue de $^{14}\text{C-T}$ et $^3\text{H-}\Delta 4$ constatent une augmentation d'environ 35 % de ces deux stéroïdes dans le plasma lorsque le sujet passe de la position couchée à la position debout : ces auteurs expliquent ce résultat par la diminution du MCR

consécutive à la diminution du flux sanguin hépatique de la position couchée à la position debout. Cette hypothèse ne peut être retenue : d'une part Southren et al. (264) ont mesuré le MCR de la testostérone chez deux hommes adultes à trois reprises au cours de 24 h ; alors que la testostérone plasmatique chute respectivement de 45 et 40 %, le MCR ne varie pas dans le même temps dans les deux cas. D'autre part, nous avons montré l'absence de variation de même sens de la testostérone plasmatique et de l'affinité de liaison de l'hormone pour sa protéine spécifique. Etant donné la relation étroite entre la clearance métabolique et l'affinité de liaison de l'hormone, on peut donc admettre que la variation circadienne de la testostérone n'est pas en rapport avec une modification éventuelle de son métabolisme. Remarquons enfin, que les modifications éventuelles du flux hépatique consécutives aux changements de posture au cours des 24 h ne sauraient intervenir dans notre étude : tous les prélèvements ont été effectués chez des sujets ayant conservé leurs activités diurnes normales et le dernier échantillon nocturne a été prélevé le sujet n'étant pas encore couché. Dans l'étude de Southren et al. il n'y a pas eu non plus de variation de posture pendant l'épreuve, qui a été réalisée chez des sujets hospitalisés et couchés.

En conclusion, la constance de la valeur du MCR au cours des 24 h et la baisse nocturne de la testostérone plasmatique doivent entraîner une diminution de la production de la testostérone.

d - Testostérone et stimulines hypophysaires.

La variation circadienne de la testostérone chez l'homme est-elle en rapport avec une variation circadienne de sa stimuline hypophysaire ? Les résultats des dosages radio-immunologiques de LH et FSH plasmatiques qui ont été faits depuis 1966 ne plaident pas en faveur d'une telle hypothèse. Si Fairman et al. (276), Saxena et al. (277) trouvent une valeur de FSH plasmatique plus élevée le matin que le soir, ils ne constatent pas, avec d'autres auteurs (278, 280) de fluctuations significatives de LH plasmatique.

e - Testostérone et ACTH.

Etant donné que la preuve du rythme n'est apportée que chez l'homme adulte, c'est chez lui seulement que nous envisagerons les relations de la testostérone avec l'ACTH. Les informations à ce sujet sont contradictoires. Hudson et al. (271), et Southren et al. (281) ne trouvent pas de modification de la testostérone plasmatique après perfusion de 25 U d'ACTH (pendant 8 h, deux jours consécutifs). Kirschner et al. (282) après injection intra-musculaire d'ACTH (40 U par jour pendant 5 jours) constatent une faible diminution de la testostérone plasmatique chez deux sujets et une forte augmentation chez deux autres. Par contre, d'autres auteurs ont constaté une baisse significative de la testostérone plasmatique sous ACTH : Sorcini et al. (283), Rivarola et al. (284) et nous même, comme le montre le tableau XXXIX. Rivarola et al. ont montré en outre qu'il n'y a pas de modification du MCR de la testostérone sous ACTH et concluent de ce fait à une diminution de la production

TABLEAU XXXIX

Testosterone plasmatique en $\mu\text{g}/100\text{ ml}$: à 07 h de base et à 13 h après une perfusion de 25 U. d'ACTH pendant six heures chez un homme normal et chez trois hommes présentant une hyperthyroïdie (HT)

Noms	Age	Diagnostic	Testostérone plasmatique	
			base (07 h)	après ACTH
MOST.	36	normal	0,61	0,44
LEVE.	55	HT	1,27	0,90
BACQ.	56	HT	2,38	1,87
GRIM.	23	HT	3,00	2,29

de cette hormone sous l'effet de l'ACTH exogène. En tenant compte de ces résultats, on doit se demander par quel mécanisme l'ACTH fait baisser la production de la testostérone chez l'homme adulte : action directe par inhibition de la sécrétion de testostérone, ou indirecte par l'intermédiaire de la sécrétion surrénalienne d'androgènes et (ou) d'oestrogènes ? Dans cette dernière hypothèse, la sécrétion accrue des androgènes et (ou) d'oestrogènes surrénaux pourraient inhiber la production de LH et ainsi diminuer la sécrétion de testostérone par les testicules.

CONCLUSION

Dans ce travail, nous avons détecté un rythme circadien de la testostérone chez l'homme adulte sain et nous en avons estimé les différents paramètres : période, amplitude, acrophase...

Nous avons recherché certaines relations temporelles de ce rythme et tenté de préciser à quel système circadien il appartient. Nous avons montré que le rythme de la testostérone plasmatique semble sous la dépendance d'une variation de la production et non de celle du catabolisme de l'hormone. Ceci nous a conduit à discuter l'éventualité d'une variation circadienne de la stimuline hypophysaire correspondante et le rôle que pourrait jouer les variations circadiennes de la sécrétion d'ACTH.

Quelles sont les conséquences de l'existence d'un rythme circadien de la testostérone plasmatique ?

Tout d'abord d'un point de vue méthodologique : le taux de production de la testostérone calculé à partir des données plasmatiques est faux par excès. En effet, l'injection unique ou la perfusion continue de testostérone tritiée est faite en général dans la matinée, temps pendant lequel la testostérone plasmatique est à un niveau élevé et relativement constant. La valeur de la production de testostérone établie pendant ce laps de temps est une donnée expérimentale réelle mais, rapportée à 24 h, elle indique seulement la limite maximale qu'elle peut atteindre et non la valeur moyenne de 24 h. Or l'amplitude du rythme de la testostérone bien qu'inférieure à celle du cortisol ou celle de la Δ^4 -androstènedione (270) n'est pas négligeable (20 à 45 % suivant les cas) et sa méconnaissance peut entraîner des conclusions erronées.

L'autre conséquence est plus générale : c'est la signification physiologique du rythme de la testostérone chez l'homme. Il est bien évident que nous ne pouvons pas répondre par l'instant à cette question, étant donné que nous n'avons pas d'information sur la structure temporelle de ce rythme. Mais on peut penser que, chez l'homme le décalage de phase qui existe dans le plasma entre, par exemple, le sulfate de DHA, le sulfate d'androstérone, la Δ^4 -androstènedione et le cortisol puisse présenter une signification physiologique. La liste de ces stéroïdes n'est pas limitative :

nous indiquons seulement ceux pour lesquels une variation circadienne a été détectée. C'est ainsi que Colas et al. (285) dans un travail récent, réalisé chez des Rats font intervenir l'existence possible d'un rythme circadien des androgènes et en particulier de la testostérone pour expliquer leurs résultats : des rats mâles sont soumis de 07 h à 16 h à l'action de la lumière artificielle et sont dans l'obscurité le reste du temps : toutes les 4 h, on décapite des lots de rats et on prépare des microsomes hépatiques : leur activité d'hydroxylation (en 7α et en 16α) de la DHA est régulièrement mesurée et montre un croisement des courbes avec notamment à 10 h un maximum pour la 16α -hydroxylation et un minimum pour la 7α -hydroxylation.

CHAPITRE VI

LIAISONS STEROIDES-PROTEINES SERIQUES

ASPECTS QUANTITATIFS

I - METHODOLOGIE

L'existence dans le sérum de protéines ayant une forte affinité de liaison pour certains stéroïdes devait nous conduire à apprécier l'index de liaison des différents stéroïdes dont nous venons d'étudier le métabolisme. Au moment où nous envisagions ce travail, Pearlman et Crépy (99) avaient mis au point, pour estimer l'index de liaison de la testostérone, un procédé que nous avons pu utiliser avant sa publication, grâce à l'obligeance et à la collaboration de Melle Crépy que nous remercions vivement. Par la suite, nous avons adapté cette technique aux autres stéroïdes envisagés dans ce travail, et avons comparé les informations obtenues dans ces conditions avec celles obtenues après dialyse à l'équilibre dans des sacs de cellophane, contre une solution d'albumine.

- Remarques préliminaires.

Tous les stéroïdes radioactifs tritiés que nous avons utilisés étaient d'activité spécifique élevée (suivant les lots, cette activité variait de 40 à 55 Ci/mM). Ils ont été purifiés par chromatographie sur colonne de célite et en couche mince dans les systèmes appropriés et leur pureté testée régulièrement : ils ont été conservés à + 4°C dans un mélange benzène/méthanol, 1/1. Les solutions aqueuses de stéroïde ont été préparées environ 2 h avant leur utilisation, la radioactivité tritiée a été mesurée dans un spectromètre à scintillation liquide, dans les conditions déjà décrites pour les solutions aqueuses. La faible quantité de protéines ajoutée n'a pas modifié l'efficacité du comptage.

A - Dialyse à l'équilibre selon le procédé de Pearlman.

Etant donné les variations de certains paramètres en fonction du stéroïde testé, nous ferons un bref résumé du protocole suivi.

Principe.

Le Séphadex G 25, fin, est utilisé dans une technique analogue à une dialyse à l'équilibre, la protéine, P, et le stéroïde, Sb, sont exclus du gel et restent dans la phase externe ; le stéroïde non lié, Su, se partage librement entre les phases externe et interne au gel. Le coefficient de partage, K', dépend de la température, de la force

ionique, du pH du tampon et de la nature du stéroïde. Si l'on ajoute des protéines sériques à la solution, celles-ci restent dans la phase externe et fixent une fraction de stéroïde sans modifier le coefficient de partage de l'hormone libre entre les deux phases.

Protocole expérimental.(tableau XL).

La concentration molaire du stéroïde tritié est faible, de l'ordre du μg et constante d'une expérience à l'autre..

Variations de K' .

Etant donné la dilution très grande du sérum (1/20e au 1/200e), la présence de protéines ne doit pas modifier la valeur de K' (99). D'autre part pour le même stéroïde, K' est sensiblement constant dans de larges limites de concentrations du stéroïde (Fig. 37). Il est indispensable d'apprécier la valeur de K' au cours de chaque expérience. Toute valeur s'éloignant de la moyenne expérimentale doit faire rejeter le dosage. Il existe de grandes différences de K' selon le stéroïde testé, comme le montre le tableau XLI. Toutes les valeurs obtenues s'éloignent du chiffre théorique 3, qui est celui du rapport des volumes externe (1,5 ml) et interne (0,5 ml). Cette divergence par rapport à la valeur théorique peut être attribuée à l'adsorption du stéroïde sur la matrice du gel comme l'a montré Gelotte (286) avec une grande variété de composés. Si nous considérons les valeurs respectives de K' que nous avons obtenues pour chaque

TABLEAU XL

Dialyse à l'équilibre, en présence de Séphadex G 25.
Protocole expérimental.

N° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Séphadex G 25 (200 mg)	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
Tampon phosphate (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
Contact une heure à la température du labo.												
Stéroïde ^3H dans tampon (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Sérum dilué (ml)	0	0	0	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0	0	0	0
Tampon phosphate (ml)	0,9	0,9	0,9	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	1,9	1,9	1,9	1,9

Agitation une heure à 25°C. Repos une heure, comptage.

1 - La concentration molaire du stéroïde tritié est faible et constante.

2 - La radioactivité totale, a, ajoutée dans chaque tube est obtenue à partir des tubes 9 à 12

3 - K' , facteur de partage est égal à $x/a-x$, x étant la radioactivité de la phase aqueuse, après équilibre, obtenue à partir des tubes 1 à 4.

4 - $\text{Su/Sb} = K' (a-x)/K'-(a-x)$, est calculé pour chaque tube 5 à 8.

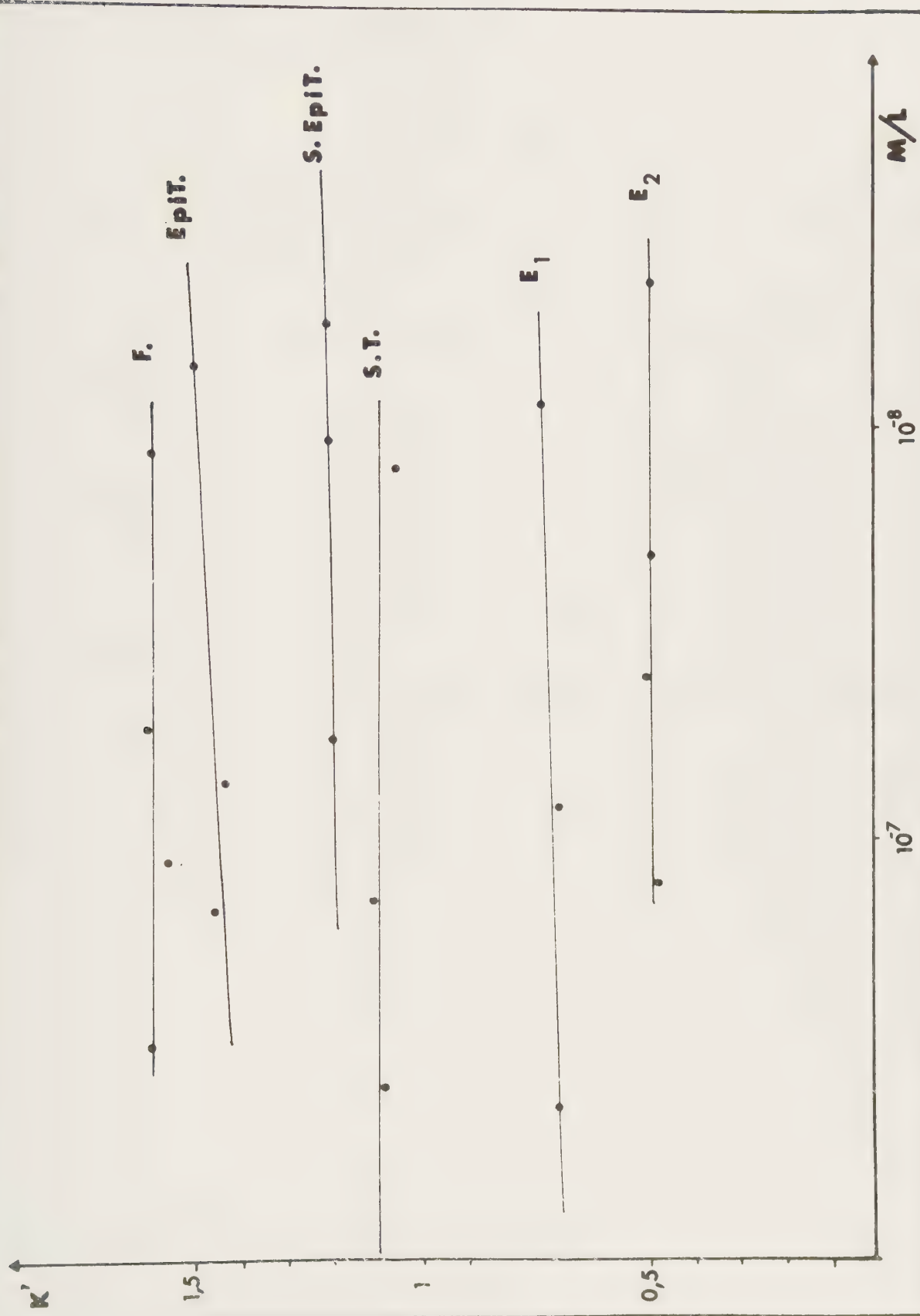


Fig. 5'

Variations du coefficient de partage K' en fonction de la concentration de différents stéroïdes (Moles/litre).

TABLEAU XLI

Dialyse à l'équilibre, en présence de Séphadex G 25 :
Variations du coefficient de partage K' suivant la nature du stéroïde.

	K' (Moyenne $\pm$ une déviation standard)	
Oestradiol	0,48 $\pm$ 0,07	n = 20
Testostérone	1,15 $\pm$ 0,07	n = 50
Sulfate de testostérone	1,19 $\pm$ 0,04	n = 9
Epitestostérone	1,42 $\pm$ 0,08	n = 5
Sulfate d'epitestostérone	1,25 $\pm$ 0,12	n = 5
Cortisol	1,51 $\pm$ 0,12	n = 20

n = Nombre de mesures.

stéroïde, il ne semble pas que le phénomène d'adsorption soit le seul facteur à envisager : en effet, l'écart entre les valeurs de K' est plus grand entre testostérone et oestradiol-17 β , qu'entre testostérone et cortisol. Il semble que le caractère phénolique de la molécule d'oestradiol intervienne pour diminuer la valeur de K' . La même remarque peut être faite en ce qui concerne le K' de l'oestrone qui est voisin de celui de l'oestradiol. Par contre la sulfo-conjugaison de la testostérone et de l'épitestostérone ne modifie pas d'une manière significative la valeur de K' , comparée au K' des formes libres respectives.

Affinité de liaison ($1/P$).

Si pour une concentration fixe et très faible du stéroïde tritié, on fait varier la concentration en protéine, le rapport Su/Sb varie linéairement en fonction de $1/P$ pour des valeurs de Su/Sb comprises entre 0,3 et 1,8. Ces limites ont été trouvées valables pour tous les stéroïdes testés. A 50 % de liaison ($Su/Sb = 1$), l'affinité de liaison $(Sb/Su) \times (1/P)$, est alors égale à $1/P$, exprimée en litres de sérum par gramme de protéine ; la figure 38 montre le type de droite obtenue dans différentes conditions.

Activité de liaison ($\Delta 1/P$).

Lorsque la mesure de l'affinité est faite après chauffage du sérum une heure à 60°C, la valeur de $1/P$ est plus ou moins diminuée selon la nature du stéroïde. Cette

affinité résiduelle concerne principalement la liaison avec l'albumine, qui est stable à cette température. Si l'on déduit la valeur résiduelle après chauffage à 60°C de celle obtenue dans les conditions normales à 25°C, nous obtenons $\Delta l/P$, ou "activité" de liaison.

Variations de l/P en fonction de l/Sb .

L'étude a été réalisée en faisant varier la concentration du stéroïde ajouté, de 0,5 à 4 μg . Nous pouvons constater (Fig. 39) que dans les conditions habituelles de dosage, la variation de l/P en fonction de l/Sb est faible.

Dosage des protéines.

Au début de ce travail, les protéines ont été dosées par la méthode de Lowry (287) qui est plus sensible mais plus délicate et moins spécifique que la méthode du biuret (288), rapidement adoptée ; le sérum albumine humaine a été utilisée comme standard.

Conservation du sérum.

Le sérum d'un sujet normal a été réparti dans des tubes à hémolyse stériles (1 ml par tube). Un lot a été conservé à +4°C et un autre à -20°C. L'affinité de liaison de la testostérone a été évaluée régulièrement tous les 3 jours : aucune baisse de l/P n'a été observée après 15 jours à +4°C et un mois à -20°C.

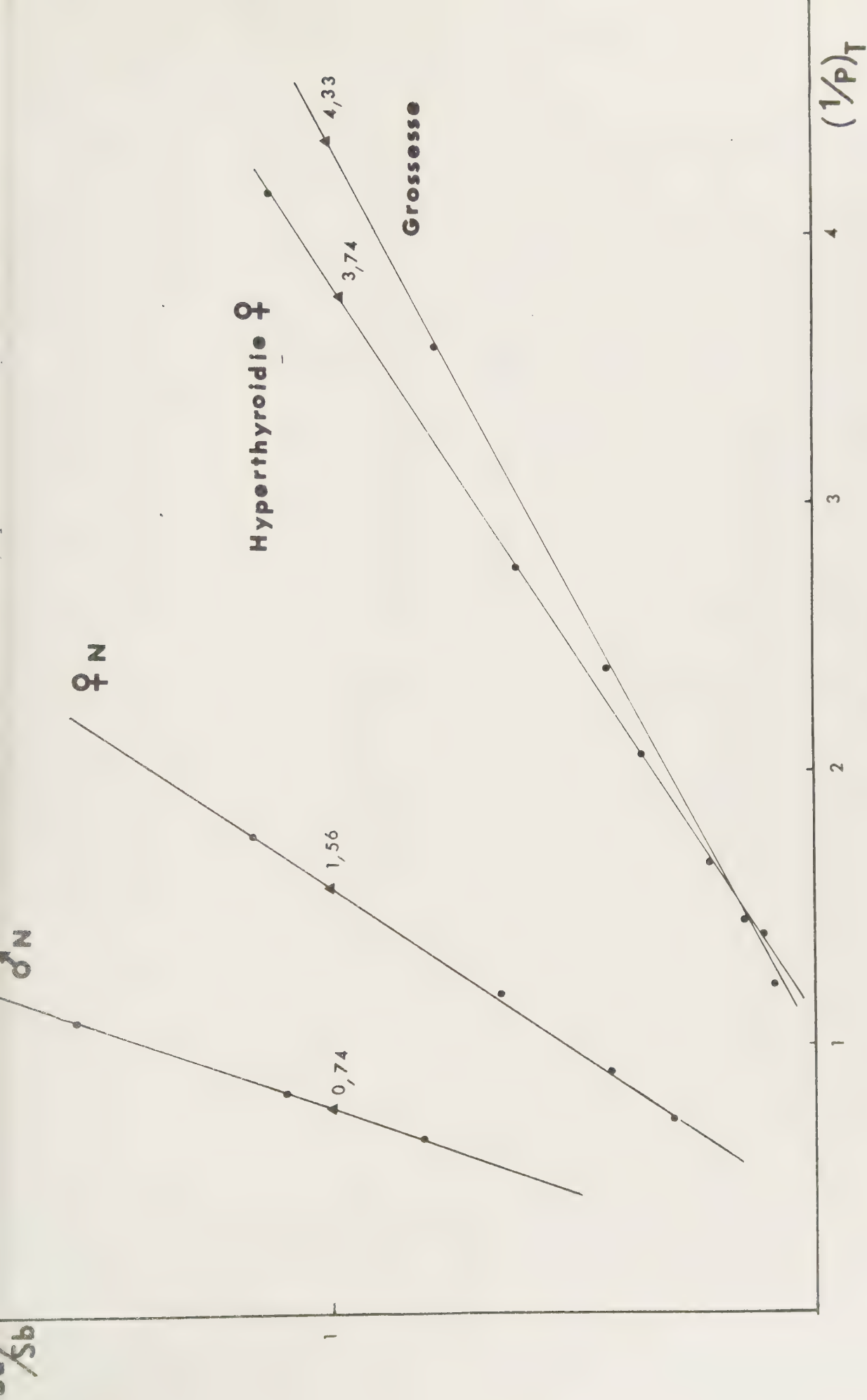


Fig. 38

Exemples des droites obtenues, en portant Su/Sb en ordonnée, et en abscisse l'inverse des différentes concentrations protéiques. Pour $Su/Sb = 1$, $1/P$ (en L/g) représente l'affinité de liaison.

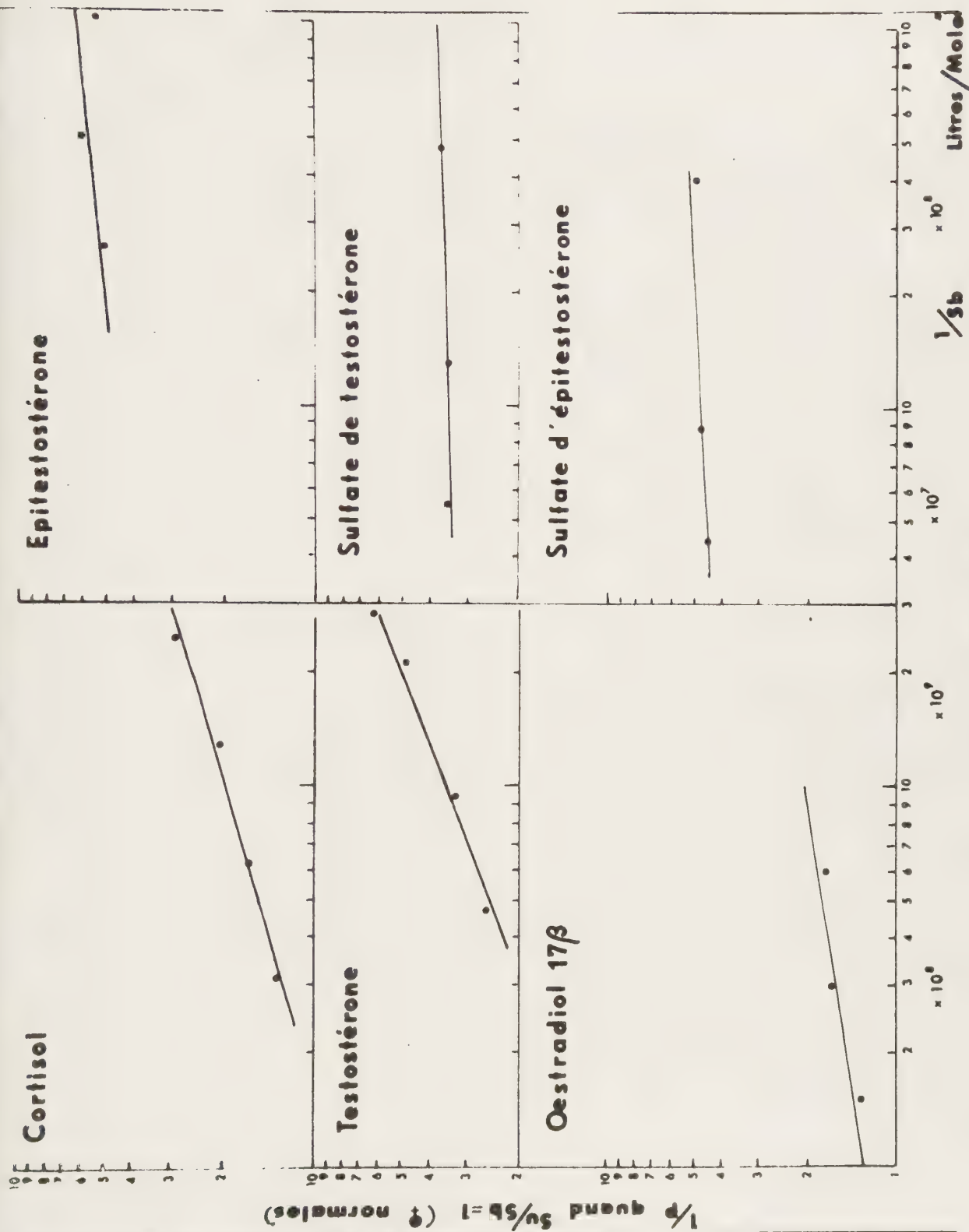


Fig. 39

Variation de (l/P) en L/g de protéine, en fonction de l/Sb en L/Mole de stéroïde lié :
représentation $\log/\log$.

Reproductibilité.

Nous avons dosé le même jour sur 5 exemplaires, l'affinité de liaison de la testostérone d'un sérum. Les valeurs suivantes ont été obtenues : 0,96 - 0,94 - 0,97 - 0,98 - 0,97 L/g, l'erreur est inférieure à 5 %.

B - Dialyse à l'équilibre et dans des sacs de cellophane, de sérum dilué, contre une solution d'albumine.

Cette technique permet de mesurer la capacité de liaison et la constante d'association du sérum pour un stéroïde donné en éliminant l'action liante de la sérum-albumine : elle a été utilisée pour la testostérone.

1 - Protocole.

Les sacs de cellophane sont préparés selon le procédé de Westphal (290) : 5 ml de sérum dilué sont dialysés contre 10 ml d'une solution tamponnée de sérum-albumine humaine (sérum dilué au 1/5ème et solution d'albumine à 1 % chez le sujet normal, sérum dilué au 1/20ème et solution d'albumine à 0,25 % dans la grossesse et l'hyperthyroïdie). On ajoute dans chaque fiole la même quantité de testostérone tritiée, une quantité croissante de testostérone non radioactive, 100 µg de streptomycine et 2500 U. de pénicilline (291). La dialyse est poursuivie 20 h à 37°C. La radioactivité est mesurée en double dans 0,2 ml de chaque phase externe et interne après addition de 5 ml de liquide scintillant.

2 - Représentation graphique.

Le stéroïde lié (B) à la fraction non albuminique du sérum et le stéroïde libre (U) sont reliés par la formule de Tait (181) exploitée par Vermeulen dans le cas de la testostérone (102) :

$$\frac{B}{U} = \frac{K_T}{N} (\Sigma_e T - B)$$

K_T : Constante d'association de la testostérone pour la fraction protéique,

$\Sigma_e T$: Concentration en site de liaison (ou capacité) de cette fraction,

N : $\Sigma_e A \cdot K_A + 1$ = constante relative à l'albumine et établie dans une expérience de dialyse à l'équilibre d'une solution d'albumine contre du tampon phosphate.

Dans ces conditions, la représentation de Scatchard (292) de B/U en fonction de B permet d'obtenir des points situés sur une droite. Dans l'hypothèse d'une protéine de liaison spécifique unique ou prédominante et ne possédant qu'un site de liaison, on peut en extrapolant, obtenir pour B/U = 0 la capacité de liaison en mole de stéroïde par litre de sérum et pour B = 0, la constante d'association (Fig. 40).

C - Stabilité des stéroïdes en solution aqueuse.

L'étude des liaisons stéroïdes-protéines se faisant en milieu aqueux, il importe d'utiliser une eau fraîchement bidistillée et une verrerie particulièrement

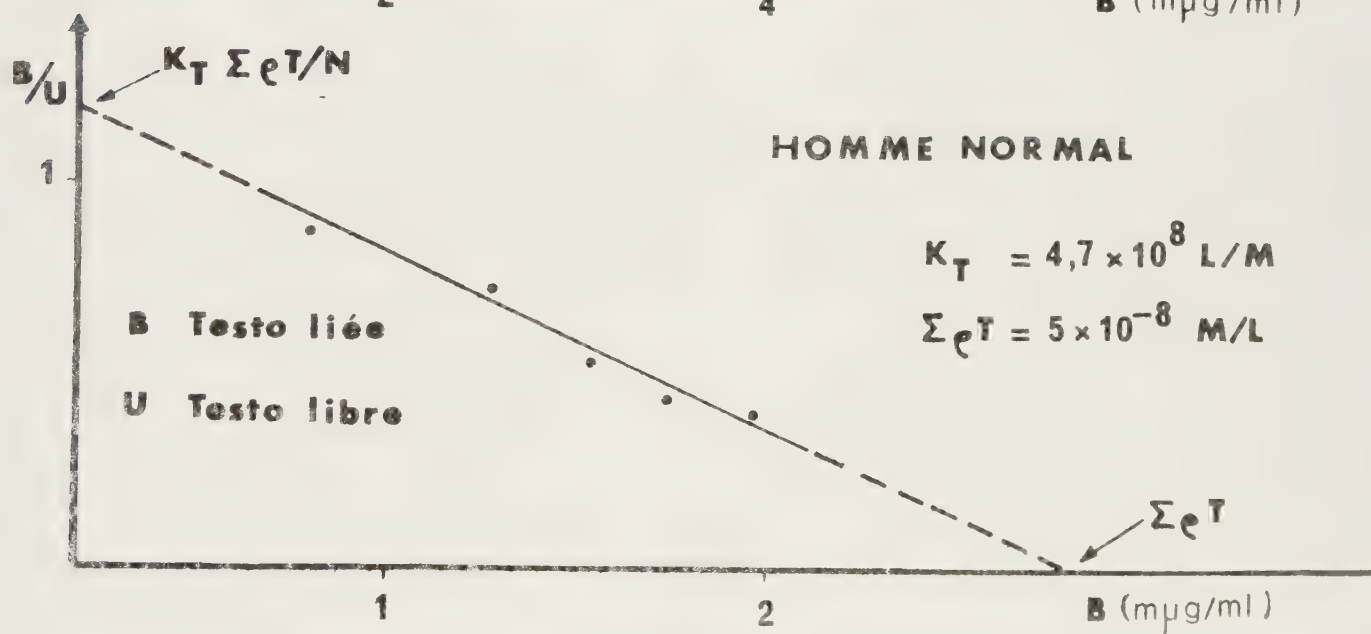
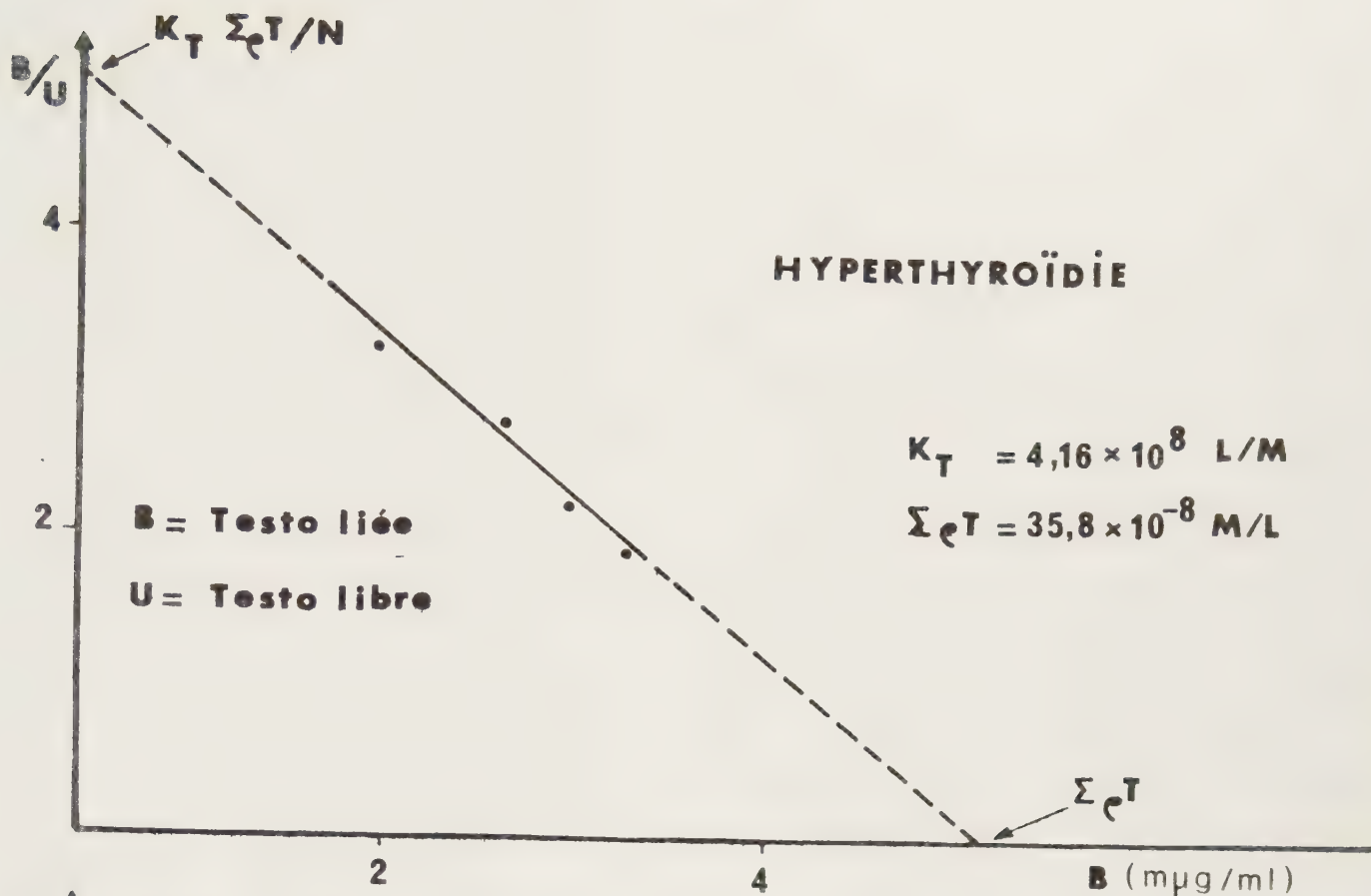


Fig. 40

Représentation graphique, selon Scatchard, de B/U en fonction de B .
(Se reporter page 199 pour l'interprétation des résultats).

propre (mélange sulfochromique, dernier lavage avec de l'eau bidistillée). Nous avons constaté, lorsque ces précautions ne sont pas observées, notamment en utilisant de l'eau seulement désionisée, la dégradation fréquente à la température du laboratoire de la testostérone et de l'épitestostérone (radioactive, ^3H ou ^{14}C et non radioactive) : ses délais d'apparition et son importance variant d'une expérience à l'autre, en général 5 à 30 % du substrat ($\approx 10 \mu\text{g/ml}$ de solution aqueuse) sont consommés en 12 à 15 h à 25°C . Nous avons identifié, après purifications chromatographiques et cristallisations répétées, les produits d'oxydation suivants : androst-4-ène-3,17-dione, androsta-1,4-diène-3,17-dione, 17β ou $17\alpha\text{-OH}$ androsta-1,4-dièn-3-one suivant que le substrat est la testostérone ou l'épitestostérone.

Le phénomène ne se produit plus à la température du laboratoire si la solution a été préalablement filtrée sur millipore, ou portée à l'ébullition pendant quelques minutes, ou additionnées d'antibiotiques, il ne se produit pas à $+ 4^\circ\text{C}$, même après un délai de 4 semaines.

Chaque fois qu'une telle transformation s'est produite l'étude bactériologique de la solution aqueuse a montré l'existence de germes où prédominaient des bactéries du genre *Pseudomonas* de type oxydatif, qui pourraient être responsables des transformations observées.

II - RESULTATS

A - Affinités de liaison des stéroïdes pour la sérum-albumine humaine et le sérum humain chauffé 1 h à 60°C.

Le tableau XLII montre les valeurs de l'affinité de liaison (1/P) de divers stéroïdes pour la sérum-albumine humaine et pour le sérum humain préalablement chauffé 1 h à 60°C : l'évolution se fait dans le même sens. Si l'on exprime les résultats obtenus avec le sérum chauffé en gramme d'albumine et non en gramme de protéines totales, ces valeurs sont du même ordre de grandeur pour un même stéroïde. La nature de la liaison avec la sérum-albumine humaine ne semble pas la même pour les stéroïdes libres et pour les sulfates de stéroïdes. En effet, le complexe ligand-sérum-albumine est dissocié après filtration chromatographique sur Séphadex G 25 dans le cas des stéroïdes libres alors qu'il ne l'est pas dans le cas des sulfates (Fig. 41).

a - Index de liaison du sérum du sujet adulte normal.

Testostérone.

Index de Pearlman : chez l'adulte, la moyenne de l'affinité de liaison $(1/P)_T$ est plus élevée chez la femme

TABLEAU XLII

Affinité de liaison de différents stéroïdes pour la sérum albumine humaine et pour le sérum humain préalablement chauffé 1 h à 60°C, exprimée en litres/g de protéine

Stéroïdes.	(1/P) _{Alb.}	(1/P) sérum 60°C
Cortisol	0,10	< 0,10
Epitestostérone	0,35	0,30
Testostérone	0,56	0,34
Oestradiol-17 β	1,31	0,68
Sulfate d'épitestostérone	3,05	0,88
Sulfate de testostérone	8,16	2,27

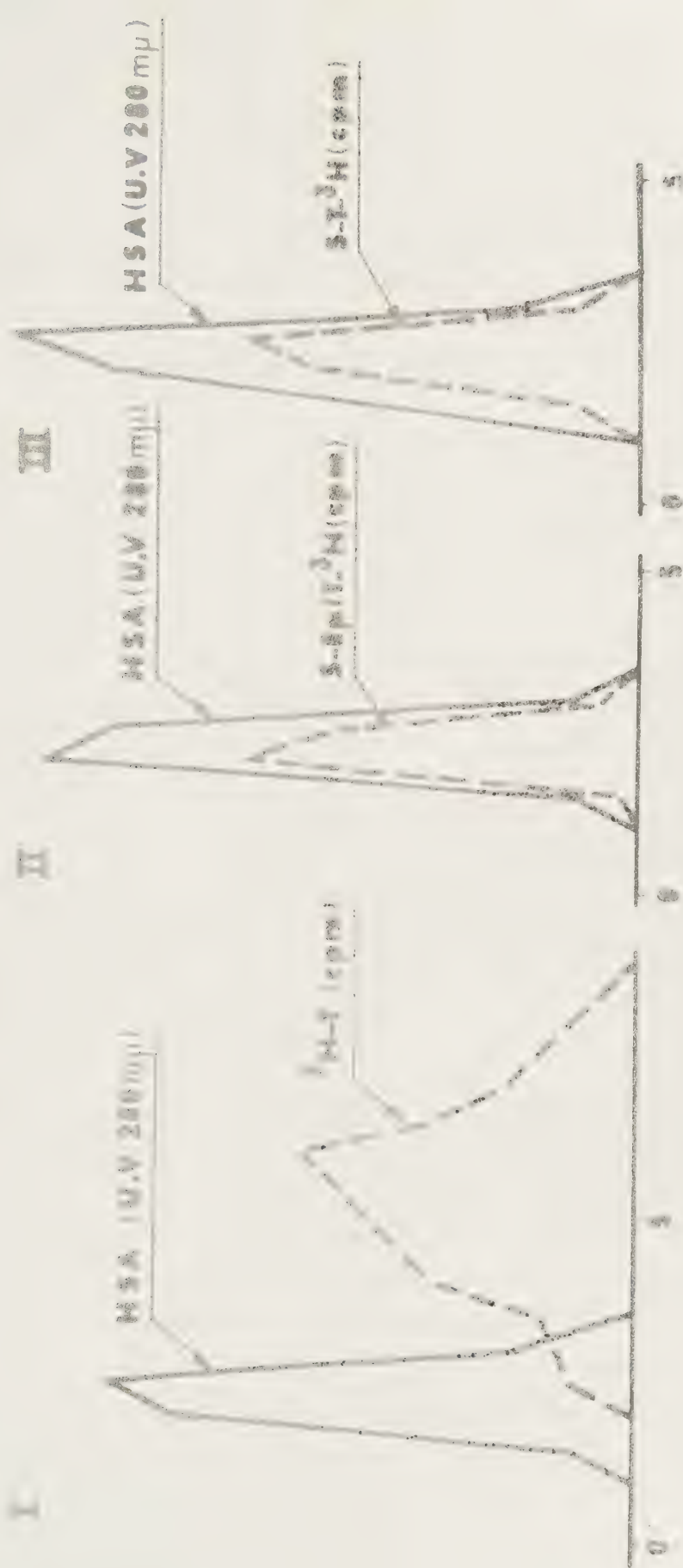


Fig. 41

Elution sur colonne de Séphadex G 25 de la sérum-albumine humaine (HSA), préalablement liée à la testostérone tritiée (courbe I), au sulfate d'épitestostérone tritiée (courbe II) et au sulfate de testostérone tritiée (courbe III).

que chez l'homme ($p < 0,01$). L'affinité résiduelle $(1/P)_T$ à 60°C ne différant pas suivant le sexe, nous retrouvons (tableau XLIII) la même différence significative au niveau des activités de liaison $(\Delta 1/P)$.

Variations de $(1/P)_T$ chez l'homme adulte normal :

- d'un jour à l'autre, à la même heure : $(1/P)_T$ a été déterminé trois jours consécutifs, entre 09 h et 10 h chez 5 sujets. La variation observée chez le même sujet était $\leq 15 \%$,
- au cours des 24 h : nous l'avons envisagée au chapitre des rythmes biologiques et montré l'absence de variations significatives de $(1/P)_T$ au cours des 24 h.

$(CL)_T$ et $(K)_T$: la capacité de liaison de la testostérone est également plus élevée chez la femme que chez l'homme ($p < 0,01$), alors que la constante d'association à 37°C ne diffère pas ($p > 0,3$) suivant le sexe (Fig. 42).

Oestradiol.

Index de Pearlman (tableau XLIII) : la moyenne de $(1/P)_{E_2}$ est plus élevée chez la femme que chez l'homme ($p < 0,01$). L'affinité après chauffage $(1/P)_{60^\circ\text{C}}$ est plus élevée que celle trouvée pour la testostérone ($p < 0,01$) et ne diffère pas suivant le sexe. Si nous comparons les valeurs des activités de liaison $(\Delta 1/P)$ de T et E_2 , nous constatons une différence significative chez la femme entre $(\Delta 1/P)_T$ et $(\Delta 1/P)_{E_2}$, alors qu'elle ne l'est pas chez l'homme.

TABLEAU XLIII

Affinités de liaison (l/P) et activités de liaison (Δ l/P) en litre de sérum par gramme de protéine de la testostérone (T) de l'oestradiol (E_2) du cortisol (F) et de l'épitéstérone (Epit). Affinités de liaison (l/P) du sulfate d'épitéstérone (S-Epit) et du sulfate de testostérone (S-T).

	E ₂			F		Epit		S-Epit		S-T	
	l/P	Δ l/P	l/P	Δ l/P	l/P	l/P	Δ l/P	l/P	Δ l/P	l/P	Δ l/P
A - HOMME											
19 - 45 ans			n = 14	n = 13	n = 10	n = 3		n = 3		n = 3	
Moyenne	0,23	0,49	1,10	0,45	1,52	0,40	0,10	1,20		4,50	
± 1 DS	0,13	0,09	0,13	0,07	0,31	-	-	-	-	-	-
B - FEMME											
20 - 41 ans			n = 14	n = 14	n = 9	n = 3		n = 3		n = 3	
Moyenne	1,45	1,14	1,39	0,75	1,68	0,42	0,12	1,30		4,10	
± 1 DS	0,23	0,09	0,23	0,14	0,39	-	-	-	-	-	-
Signification											
de la différence <0,01 <0,01 <0,05 <0,01 >0,3											
entre A et B (p)											

n = nombre de mesures.

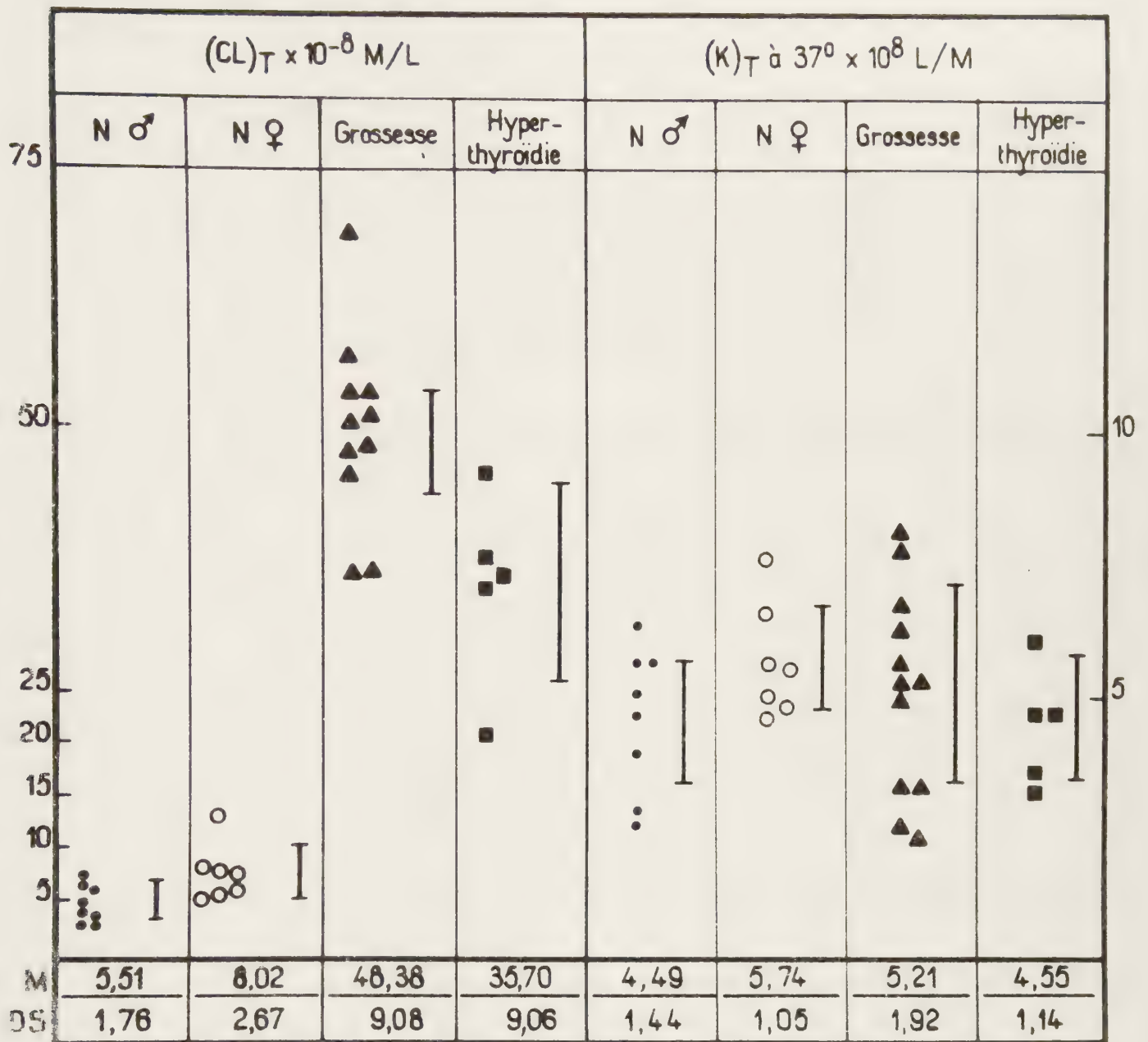


Fig. 42

Capacités de liaison de la testostérone $(CL)_T$ et constantes d'association de la testostérone $(K)_T$ établies à 37°C après dialyse à l'équilibre dans des sacs de cellophane, contre une solution d'albumine dont la concentration est égale à celle du sérum dilué. Valeurs trouvées chez les adultes normaux, dans la grossesse et dans l'hyperthyroïdie des deux sexes.

Cortisol.

Index de Pearlman : il n'y a pas de différence de $(1/P)_F$ suivant le sexe. Après chauffage à 60°C, l'affinité résiduelle est constamment $< 0,10$ L/g. Nous pouvons donc, pour le cortisol, assimiler affinité et "activité" de liaison (tableau XLIII).

Epitestostérone, sulfates de testostérone et d'épites-
tostérone.

L'affinité $(1/P)$ et l'activité $(\Delta 1/P)$ de liaison de l'EpiT sont très faibles : la liaison de ce stéroïde à des protéines sériques autres que la sérum-albumine semble donc peu probable. Les affinités $(1/P)$ de liaison du sulfate d'EpiT et surtout du sulfate de testostérone sont élevées (tableau XLIII), mais nous avons déjà noté que cela est dû en grande partie à leur liaison avec la sérum-albumine (tableau XLII).

C - Index de liaison de la testostérone avant la puberté.

Nous avons pu obtenir du sérum de quelques enfants prépubères en bonne santé. Ceci nous a permis de faire une étude préliminaire ; mais les résultats bien qu'établis sur une petite série, méritent d'être rapportés (tableau XLIV).

Le garçon prépubère, âgé de 6 à 10 ans $1/2$, a une affinité de liaison $(1/P)$ et une activité de liaison $(\Delta 1/P)$ de la testostérone, intermédiaire à celle de l'homme

TABLEAU XLIV

Affinité de liaison ($1/P$) et activité de liaison ($\Delta 1/P$) de la testostérone chez l'enfant prépubère

	Age	$(1/P)_T$	$(\Delta 1/P)_T$
<u>FILLES</u>			
GASC.	5	1,74	1,44
BEDI..	6	1,85	1,52
VEAU.	7	1,77	1,46
COSS.	7	1,94	1,73
FENE.	10	1,49	1,14
BRUY.	11	2,15	1,69
Moyenne		1,82	1,49
± 1 DS		0,21	0,20
<u>GARCONS</u>			
BENF.	6	1,45	1,12
ZOUA.	7	0,88	0,63
JAMI.	9	1,19	0,78
BECC.	11	1,50	1,26
MART.	11	1,45	1,01
URA .	10 ½	1,54	1,26
Moyenne		1,33	1,01
± 1 DS		0,84	0,25
Signification de la différence des moyennes entre filles et garçons.			
		$p < 0,01$	$p < 0,01$

adulte et de la femme adulte, alors que la fille (même tranche d'âge, 5 à 11 ans) a une affinité de liaison significativement plus élevée que celle de la femme adulte.

D - Facteurs influençant la liaison de la testostérone, de l'oestradiol et du cortisol aux protéines du sérum humain.

L'étude des variations physiopathologiques et pharmacologiques des affinités de liaison a été limitée aux stéroïdes liés d'une manière importante à des protéines autres que la sérum-albumine : la testostérone, l'oestradiol et le cortisol. Les résultats complets ont été publiés (293-299) dans des revues spécialisées. L'incursion dans le domaine pathologique se justifie dans la mesure où les modifications constatées peuvent aider à une meilleure compréhension du rôle physiologique de la liaison.

Hormones sexuelles.

1 - Au cours de la grossesse (Fig. 42 et 43).

L'affinité de liaison ($1/P$) de T, E_2 et F est significativement élevée : après chauffage à 60°C , l'affinité résiduelle n'est pas modifiée d'une manière significative, laissant supposer que la liaison avec la sérum-albumine est peu modifiée. D'autre part, après dialyse à l'équilibre contre une solution d'albumine, nous constatons que c'est la capacité de liaison qui est modifiée, alors que la constante d'association est normale (Fig. 43) ; il s'agit donc d'une disponibilité accrue en protéines "spécifiques", soit par ralentissement de leur métabolisme, soit par augmentation de leur synthèse. Les expériences faites avec de la transcortine marquée avec ^{131}I plaident pour la seconde éventualité chez la femme enceinte (89).

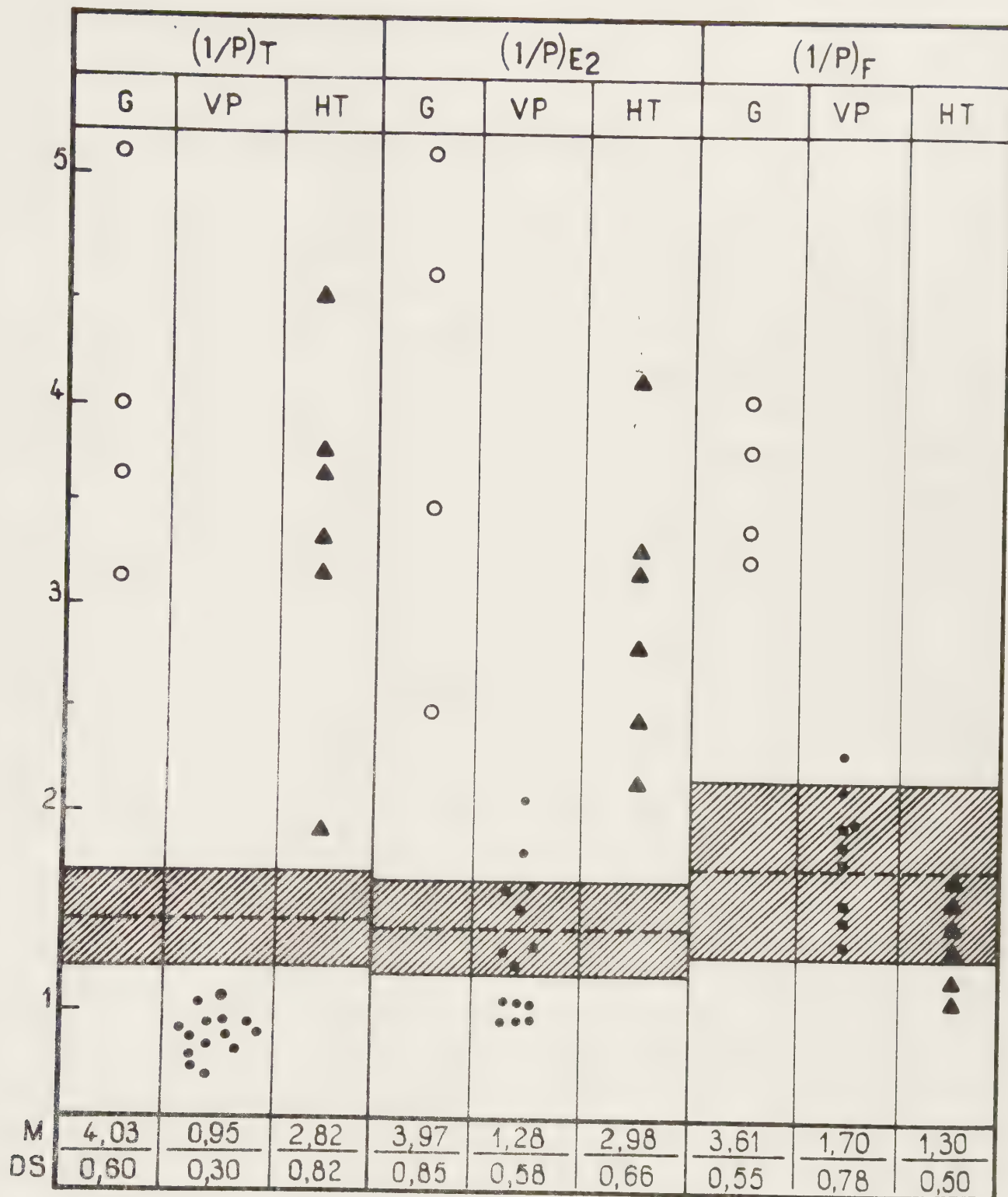


Fig. 43

Affinités de liaison en L/g de protéine de la testostérone $(1/P)_T$, de l'oestradiol $(1/P)_{E2}$ et du cortisol $(1/P)_F$, dans la grossesse (G), le virilisme pileire (VP) et dans l'hyperthyroïdie féminine.

2 - Administration d'oestrogènes.

L'absence de variation significative de l'affinité de liaison de la testostérone chez la Femme au cours du cycle, son élévation importante dans les deux sexes, sous l'effet de doses supra-physiologiques d'éthinyl-oestradiol sont des faits déjà rapportés (88, 89). Un cas intéressant que nous analyserons plus loin, est celui d'une insuffisance thyroïdienne périphérique chez un homme de 65 ans : $(1/P)_T$ était à 1,03 L/g dans les conditions de base. le sujet étant **sans** traitement, s'élevait à 1,31 au 5e jour et à 2,10 au 10e jour de l'administration de 1 mg/jour pendant 10 jours d'éthinyl-oestradiol.

3 - Rôle des androgènes.

α - Virilisme pileaire.

Sur une étude de 64 cas (Fig. 44) de virilisme pileaire d'origine variée (dont 72 % de virilisme pileaire idiopathique, sans anomalie ovarienne), l'affinité de liaison de la testostérone a été trouvée abaissée ($p < 0,01$). Il n'y avait ni de relation entre la variété clinique du virilisme et l'importance de la baisse de $(1/P)_T$, ni de corrélation entre le taux de la testostérone plasmatique et $(1/P)_T$. La valeur faible de l'affinité de liaison de la testostérone plasmatique était l'anomalie la plus constamment rencontrée (87 % des cas) alors que le taux de la testostérone plasmatique n'était augmenté que dans 37 % des cas (297, 299).

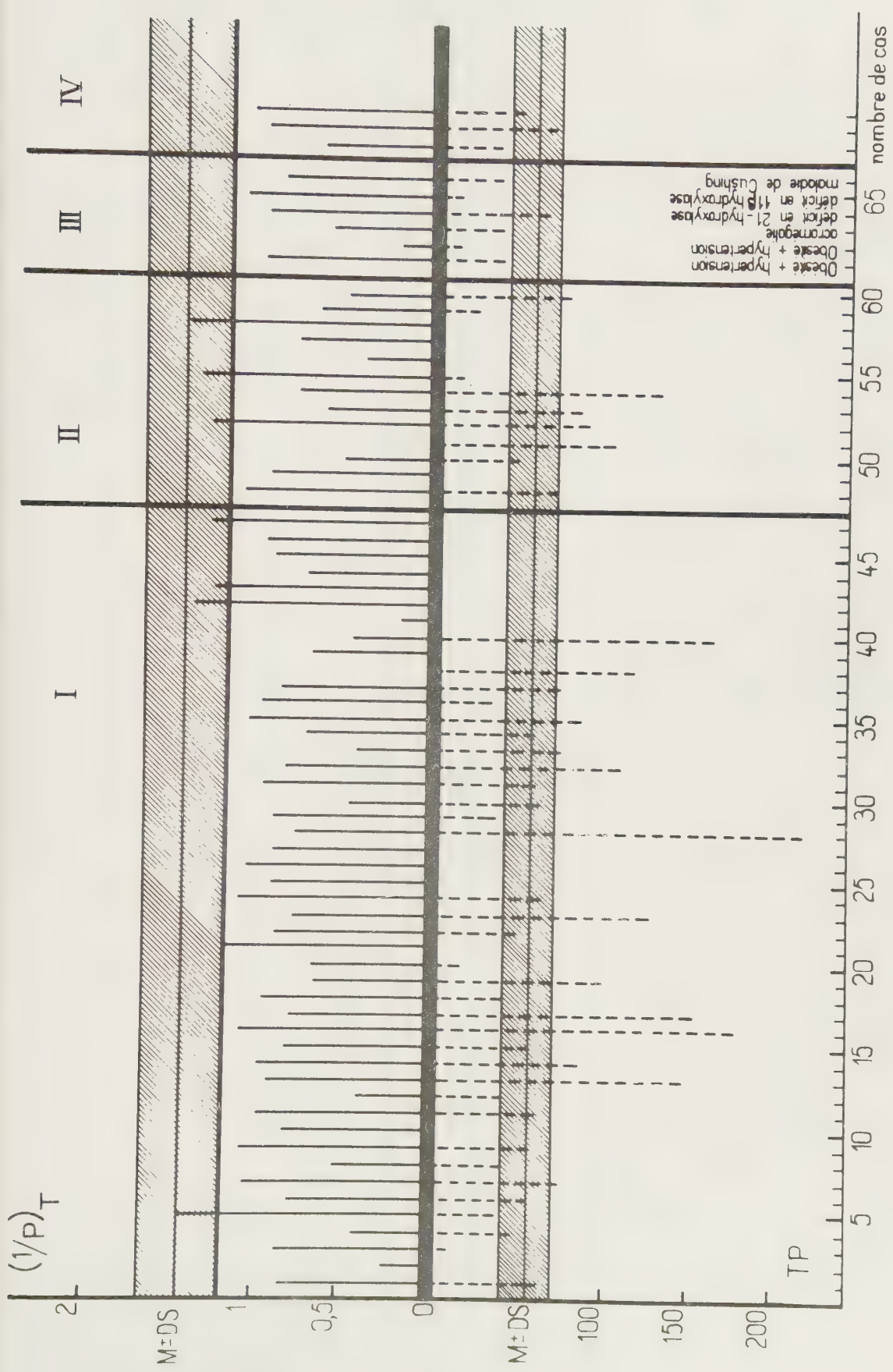


Fig. 44

Affinité de liaison de la testostérone ($(1/P)_T$) en L/g de protéine, et testostérone plasmatique (TP) en $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ dans le virilisme pileaire.

- I - Virilisme pileaire idiopathique.
- II - " associé à des troubles des règles.
- III - " symptôme d'une maladie.
- IV - " après androgénotherapie.

L'index de liaison de l'oestradiol mesuré conjointement avec celui de la testostérone dans une étude de 14 cas de virilisme pileux idiopathique était soit abaissé (50 %) soit normal (50 %) : l'affinité de liaison après chauffage à 60°C, par contre n'était modifiée ni pour la testostérone ni pour l'oestradiol. Dans 9 de ces cas, la mesure de l'affinité du cortisol a été faite et trouvée normale (Fig. 43).

β - Retard pubertaire masculin (tableau XLV).

Il s'agit d'un groupe homogène de 7 cas d'impubérisme gonadotrophique masculin dont le taux de la testostérone plasmatique était significativement abaissé. L'affinité de liaison $(1/P)_T$ était élevée et ne différait pas significativement de la valeur trouvée chez la femme adulte normale ni de celle du garçon prépubère.

γ - Administration d'HCG.

Le nombre de cas étudiés est restreint et se limite aux retards pubertaires masculins (administration de 1500 unités d'hormone gonadotrope chorionique, à raison de trois injections intramusculaires par semaine pendant 4 semaines). Nous pouvons cependant noter, sous l'action de cette stimuline, une évolution inverse de la valeur de l'affinité de liaison de la testostérone et du taux de la testostérone plasmatique (tableau XLV).

TABLEAU XLV

Affinité de liaison $(1/P)_T$ en L/g et testostérone plasmatique en $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ au cours des retards pubertaires masculins. Modifications de $(1/P)_T$ sous l'effet de HCG ou des androgènes (voir le texte pour la posologie).

Noms	Age	Base		Sous traitement	
		$(1/P)_T$	T P	$(1/P)_T$	T P
1 GCD.	14	1,12	0,052	1,00	0,420 HCG
2 PHI.	14	1,00	0,089	0,98	HCG
3 THO.	18	1,48	0,210	1,06	0,400 HCG
4 FON.	18	1,23	0,190		0,570 HCG
5 ROB.	15	1,09	0,110		
6 GER.	18	1,54	0,024		
7 CON.	40	1,35	0,120	0,70	0,760 Androgènes
Moyenne		1,26	0,113	0,94	0,537
+ 1 DS		0,20	0,068	0,16	0,166

§ - Administration d'androgènes.

Elle a été faite sous forme d'œnanthane de testostérone, d'une part chez 3 femmes qui ont vu se développer un virilisme pileux et chez lesquelles $(1/P)_T$ était bas, d'autre part chez l'impubère, obs. n° 7 du tableau précédent, où nous retrouvons la même évolution inverse de la testostérone plasmatique et de $(1/P)_T$.

ξ - Puberté précoce.

L'affinité de liaison de la testostérone a été mesurée dans le sérum de 4 garçons âgés de 4 à 8 ans présentant une puberté précoce. La moyenne $\pm$ DS ($0,97 \pm 0,15$ L/g) ne diffère pas de celle de l'adulte normal.

Hormones thyroïdiennes.

1 - Hyperthyroïdie (293-296, 299).

α - Testostérone : l'affinité de liaison $(1/P)_T$ est élevée ($p < 0,001$) dans les deux sexes (Fig. 43 et tableaux XLVI et XLVII) et sans modification de l'affinité résiduelle après chauffage à 60°C . Cette élévation porte sur la capacité de liaison alors que la constante d'association ne diffère pas significativement de la normale (Fig. 42).

TABLEAU XLVI.

Thyrotoxicose masculine évolutive : (19 cas).

		Age	Durée d'évolution	Perte de poids	T	1/P
1	LUS.	62	4 ans	18	2,58	-
2	HEN.	21	10 mois	9	2,40	2,12
3	BAC.	56	5 ans	5	2,38	2,82
4	LEC.	36	1 an	13	2,36	-
5	LEB.	42	6 mois	5	2,33	2,20
6	GRI..	23	5 ans	20	2,16	3,50
7	SEL.	39	1 an	18	2,05	-
8	MAU.	38	2 mois	8	1,88	-
9	DEL..	46	1 an	5	1,76	-
10	RIC.	55	3 mois	7	1,44	2,14
11	BRO.	45	4 ans	12	1,39	2,20
12	LEV.	55	10 mois	14	1,27	-
13	SCH.	17	3 mois	10	1,25	-
14	BOR.	35	6 mois	12	1,21	1,50
15	SCH.	48	1 an	5	1,18	2,26
16	SER.	38	2 ans	16	1,14	1,86
17	D'AS.	59	15 mois	8	1,10	1,70
18	SER.	25	3 mois	3	1,04	1,10
19	MOR.	64	3 mois	4	0,68	1,22
Moyenne					1,66	2,05
± 1 DS					0,27	0,40
<u>Valeurs normales.</u>						
Moyenne					0,80	0,90
± 1 DS					0,12	0,30

T : Testostérone plasmatique en ug/100 ml

1/P : Affinité de liaison de la testostérone vis-à-vis des protéines sériques, exprimée en litre/g de protéine pour Su/Sb=1.

TABLEAU XLII

Thyrotoxicose féminine évolutive : (17 cas).

		Age	T	1/P
24	ADA.	40	0,024	3,40
25	BAU.	47	-	3,36
26	BLA.	30	0,208	1,92
27	BON.	62	0,010	2,82
28	BOU.	32	0,170	1,92
29	BOU.	54	0,012	2,72
30	BOU.	21	0,034	2,20
31	GAR.	47	0,017	1,53
32	GOZ.	49	0,038	2,12
33	LAE.	64	0,035	2,50
34	LAV.	47	0,074	2,81
35	MAR.	55	0,055	2,14
36	MAS.	64	0,093	1,90
37	PAR.	49	0,210	1,60
38	PEL.	48	-	1,72
39	SOU.	26	0,079	1,76
40	TEX.	34	-	1,96
Moyenne			0,079	2,25
± 1 DS			0,037	0,29
<u>Valeurs normales.</u>				
Moyenne			0,067	1,40
± 1 DS			0,05	0,30

T : Testostérone plasmatique en $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$

1/P : Affinité de liaison de la testostérone
vis-à-vis des protéines sériques, en
litre/g de protéine, pour $\text{Su/Sb} = 1$.

Nous avons montré par ailleurs, l'existence chez l'homme d'un taux élevé de la testostérone plasmatique ($p < 0,01$) : son élévation chez la femme, étant inconstante et moins importante ($M \pm DS \ 0,079 \pm 0,037 \text{ } \mu\text{g}/100 \text{ ml}$). Chez l'homme ce taux élevé de la testostérone plasmatique s'accompagne d'une diminution importante de la clearance métabolique et d'une production normale de l'hormone (tableau XLVIII).

β - Oestradiol et cortisol : une étude simultanée de $(1/P)$ de T, E_2 et F a été réalisée dans 6 cas de thyrotoxicose féminine évolutive (Fig. 43), nous constatons une élévation semblable de $(1/P)_T$ et de $(1/P)E_2$, $p < 0,001$. Par contre l'affinité de liaison du cortisol $(1/P)_F$ est légèrement diminuée ($p < 0,05$).

2 - Hypothyroïdie.

La moyenne de $(1/P)_T$ des 8 cas étudiés d'insuffisance périphérique (tableau XLIX) est plus basse que celle de la femme normale ($p < 0,01$).

3 - Administration d'hormones thyroïdiennes.

A doses substitutives : dans 5 cas d'insuffisance thyroïdienne, l'administration de L-triiodothyronine ou L-thyroxine entraîne une augmentation franche de $(1/P)_T$, avec apparition dans 3 cas de signes thyrotoxiques.

A doses pharmacologiques : chez 2 hommes normaux, l'administration de D-thyroxine, à raison de 8 mg/jour, a fait passer l'affinité de liaison de la testostérone, de

0,68 $\pm$ 1,44 L/g en 2 semaines dans un cas et de 0,83 à 1,45 L/g en une semaine dans l'autre cas. Chez 13 femmes présentant un virilisme pileux (Fig. 45), nous distinguons l'action de la L-thyroxine, qui administrée dans 4 cas à la dose de 600 à 900 μ g par jour, pendant 1 à 12 semaines, a élevé la moyenne de $(1/P)_T$ de 0,67 à 1,52 L/g, mais au prix de l'apparition de signes toxiques, et l'action de la D-thyroxine qui administrée dans 9 cas à la dose de 8 mg/jour pendant 4 à 8 semaines a élevé de façon moins importante la moyenne de $(1/P)_T$ qui passe de 0,90 à 1,34 L/g, mais sans qu'apparaissent de signes hypermétaboliques.

TABLEAU XLVIII.

Clearance métabolique (MCR) en litres/24h et taux de production (TP) en mg/24h de la testostérone dans 7 cas de thyrotoxicose masculine évolutive.

Noms	Age	T	$(1/P)_T$	MCR*	T P
2 HEN.	21	2,40	2,12	704	17
3 BAC.	56	2,38	2,82	400	9,5
10 RIC.	55	1,44	2,14	730	10,5
11 BRO.	45	1,39	2,20	426	11
14 BOR.	35	1,20	1,60	865	11
16 SER.	38	1,14	1,86	645	6,7
17 D'AS.	59	1,08	1,70	658	7,2
Moyenne		1,59	2,05	632	10,41
± 1 DS		0,48	0,37	143	2,87
<u>Hommes normaux</u>					
ACH.	44	0,75	0,85	1 326	9,9
BOU.	33	0,95	0,97	1 420	13,4

* Perfusion continue

TABLEAU XLIX

Affinité de liaison $(I/P)_T$ au cours de l'hypothyroïdie féminine.
Effet des hormones thyroïdiennes sur $(I/P)_T$ et sur l'état clinique

Noms	Age	$(I/P)_T$	
		Sans traitement	Sous traitement
1 MAT.	60	0,94	1,87 L-T4 300 γ / 3m. (E)
2 MOU.	40	1,17	3,12 L-T3 100 γ / 4s. (T)
3 VEL.	49	1,27	2,22 L-T3 75 γ / 5s. (T)
4 DAL.	74	1,06	1,67 L-T4 600 γ / 2s. (E)
5 AND.	54	0,72	1,83 L-T4 600 γ / 3m. (T)
6 BOU.	53	1,70	
7 SAT.	58	1,47	
8 HER.	84	0,65	
Moyenne		1,12	2,14
± 1 DS		0,27	0,58

(E) : Euthyroïdien

(T) : Thyrotoxique

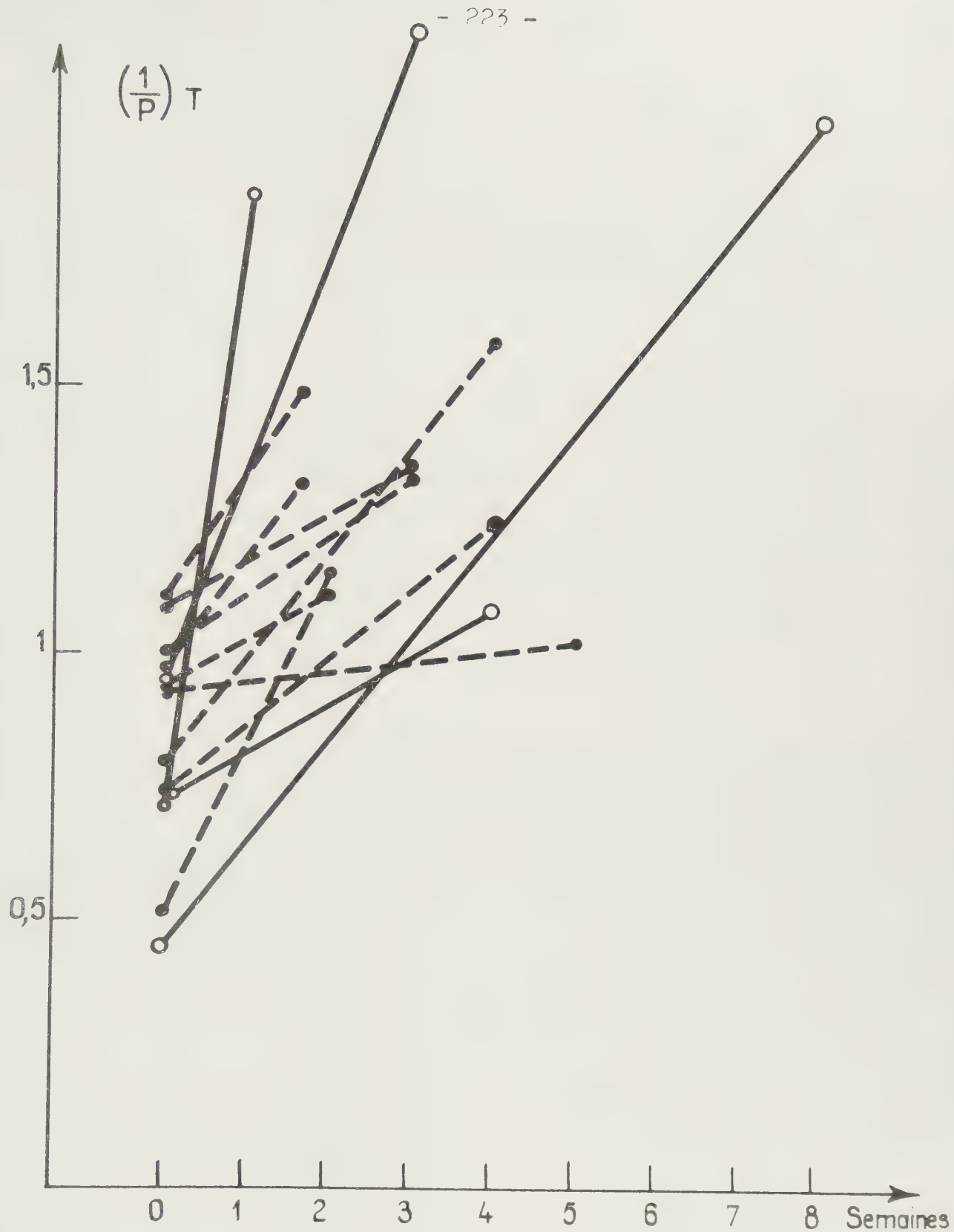


Fig. 45
Augmentation de $(1/P)_T$ après administration d'hormones
thyroïdiennes, dans 13 cas de virilisme pileux.

○ — — — — — L-thyroxine (4 cas)
● - - - - - D-thyroxine (9 cas).

III - SIGNIFICATION PHYSIOLOGIQUE DE LA LIAISON TESTOSTERONE-PROTEINES SERIQUES.

Au cours de notre travail, nous avons obtenu des informations concernant l'index de liaison de différents stéroïdes pour les protéines du sérum humain. Ces informations d'ordre physiologique, pathologique et pharmacologique sont suffisamment importantes dans le cas de la testostérone pour tenter de situer le rôle de cette liaison dans le métabolisme de cette hormone. La liaison des autres stéroïdes sera envisagée par comparaison à celle de la testostérone.

L'activité de liaison ($\Delta l/P$) de la testostérone établie selon Pearlman et Crépy et la capacité de liaison (CL) de la testostérone établie après dialyse à l'équilibre dans des sacs de cellophane contre une solution d'albumine sont plus élevées chez la femme adulte que chez l'homme adulte. Cette différence significative est retrouvée chez l'enfant (5-11 ans) avec des valeurs de $(\Delta l/P)_T$ plus élevées que chez l'adulte du même sexe. Peut-on assimiler cette différence à un caractère génétique lié au sexe ? Les valeurs de l'affinité de liaison de la testostérone dans les impubérismes masculins ne diffèrent pas significativement de celle de la femme adulte, ne plaident pas en faveur de cette hypothèse.

A - Facteurs hormonaux.

Nous avons montré que l'affinité de liaison de la testostérone était modifiée sous l'action des hormones sexuelles et des hormones thyroïdiennes.

1 - Les oestrogènes.

A doses physiologiques, l'action des oestrogènes est certainement faible étant donné, d'une part, l'absence de différence significative notée dans les impubérismes mâles et chez la femme en période d'activité génitale, d'autre part, l'absence de variation de l'affinité aux différentes périodes du cycle menstruel, enfin son élévation progressive au cours de la grossesse.

A fortes doses, les oestrogènes élèvent constamment $(1/P)_T$: dans le cas étudié (p 212), la valeur de $(1/P)_T$ est doublée après 10 jours de traitement.

2 - Les androgènes.

Si les variations circadiennes de la testostérone plasmatique n'influencent pas l'affinité de liaison de la testostérone, celle-ci s'abaisse cependant régulièrement sous l'influence d'une surcharge en testostérone obtenue chez l'homme soit par l'administration d'hormone gonadotrope chorionique, soit par celle de testostérone.

3 - Les hormones thyroïdiennes.

On ne peut affirmer que la sécrétion thyroïdienne fasse sentir son action aux doses physiologiques : les valeurs de $(l/P)_T$ mesurées chez les myxoedémateux sont peu nombreuses pour être interprétées. Néanmoins l'affinité de liaison s'élève toujours sous traitement substitutif (tableau XLIX). Il est possible que chez les myxoedémateux les variations observées de $(l/P)_T$ soient la résultante de l'insuffisance thyroïdienne elle-même et des perturbations endocriniennes et métaboliques qu'entraîne cet état. Mais aux doses pharmacologiques, quel que soit le niveau de départ de $(l/P)_T$, cette dernière est toujours sensible aux hormones thyroïdiennes. Leur action n'est pas uniquement liée à leur effet métabolique. Si en effet, les variations obtenues sous L-T₄ et sous L-T₃ sont plus amples que celles obtenues sous D-T₄, elles le sont dans le premier cas au prix de signes thyrotoxiques jamais observés avec les doses utilisées de D-T₄, tant chez l'Homme normal que chez la Femme atteinte de virilisme pileux.

4 - Mode d'action des oestrogènes et des hormones thyroïdiennes.

Les oestrogènes et les hormones thyroïdiennes agissent sur l'index de liaison de la testostérone en augmentant la capacité sans modifier la constante de liaison. Existe-t-il une relation de dépendance dans le mode d'action de ces deux groupes d'hormones? Chez le Rat, Labrie et al. dans leurs études sur la transcortine (300), ont envisagé une action directe des oestrogènes sur la TSH et

par là, sur le taux de la thyroxine plasmatique et ont fait de l'hormone thyroïdienne le seul facteur influençant la biosynthèse de la protéine spécifique de liaison. Il ne semble pas que cette hypothèse puisse valablement être avancée chez l'Homme. En effet l'expérience conduite chez un homme totalement thyroïdectomisé (voir p. 212) montre que l'oestradiol reste capable d'augmenter significativement l'affinité de liaison de la testostérone, en l'absence de toute sécrétion thyroïdienne.

B - Clearance métabolique de la testostérone (MCR).

De nombreux faits plaident en faveur d'une relation directe entre l'affinité de liaison et la clearance métabolique.

1 - Suivant le sexe.

La Femme a une affinité de liaison plus élevée et une clearance métabolique plus basse que l'Homme.

2 - Au cours du nycthémère.

Alors qu'il existe une chute nocturne significative de la testostérone plasmatique, il n'y a pas de variation contemporaine de l'affinité de liaison ni de la clearance métabolique.

3 - Au cours de l'hyperthyroïdie.

L'augmentation de l'affinité de liaison va de pair avec une diminution de la clearance métabolique ; nous avons établi cette corrélation chez l'Homme et montré que la guérison de l'hyperthyroïdie abaisse l'affinité de liaison et relève la clearance métabolique. Ces faits ont été récemment confirmés (301).

4 - Dans le virilisme pileaire.

Nous constatons une relation inverse. Alors que la clearance métabolique est augmentée (302), nous avons vu que l'affinité de liaison de la testostérone est abaissée. L'administration d'hormones thyroïdiennes augmente l'affinité de liaison et diminue la clearance métabolique. Dans un cas de virilisme pileaire, après 6 mois de traitement par la D-thyroxine (8 mg/jour), l'affinité de liaison est passée de 0,90 à 2,02 L/g, tandis que la clearance métabolique s'est abaissée de 840 à 402 L/24 h.

C - Taux plasmatique de la testostérone.

La relation entre l'affinité et le taux plasmatique de l'hormone n'a été étudiée que dans le cas de la testostérone, cette relation est différente suivant le sexe.

1 - Chez l'homme adulte.

L'affinité de liaison et le taux plasmatique de l'hormone évoluent de façon parallèle : ceci est apparent au cours de l'évolution des thyrotoxicoses masculines.

2 - Chez la femme adulte.

On ne constate pas de relation identique. L'augmentation de l'affinité constatée dans la thyrotoxicose et sa diminution dans le virilisme pileux peuvent aller de pair avec un taux plasmatique de l'hormone normal ou élevé.

D - Production de la testostérone.

Cette différence entre les 2 sexes se retrouve lorsqu'on aborde le problème de la production de la testostérone.

1 - Chez l'homme adulte.

La valeur de l'affinité ne paraît pas influencer la régulation hypothalamo-hypophyso-gonadique et le mécanisme de feed-back. Dans la thyrotoxicose masculine, où l'affinité est forte, la production quotidienne de l'hormone n'est pas significativement modifiée alors que la testostérone plasmatique est très augmentée (tableau XLVIII). Dans un travail récent, Gordon et al. (301) ont confirmé tous nos résultats et montré que la thyrotoxicose augmente électivement la fraction liée de l'hormone qui passe en moyenne de 90,5 % chez l'homme normal à 94,9 % chez l'hyperthyroïdien. Si l'on compare cette élévation relative à l'élévation du taux de la testostérone plasmatique totale, il apparaît que la valeur absolue de la testostérone non liée n'est pas modifiée : ceci peut expliquer la persistance d'une régulation normale par feed-back à condition d'admettre que seule la fraction non liée intervient dans cette régulation.

2 - Chez la femme adulte.

Le problème apparaît plus complexe et les résultats sont contradictoires. Les variations de l'affinité de liaison et de la clearance métabolique de l'hormone ne s'accompagnent pas de modifications comparables de son taux plasmatique. Ainsi la production hormonale peut-elle être élevée aussi bien dans la thyrotoxicose où l'affinité est élevée, la clearance métabolique basse, mais le taux plasmatique de l'hormone augmenté, que dans le virilisme pileaire où le taux plasmatique de l'hormone peut être normal, mais où la clearance métabolique est forte et l'affinité de liaison diminuée.

E - Caractères différentiels des protéines de liaison.

Alors que l'administration d'oestrogènes et la gravidité élèvent l'affinité de liaison des hormones sexuelles (T et E_2) et celle du cortisol (F), les hormones thyroïdiennes élèvent l'affinité de liaison des hormones sexuelles mais non celle du cortisol qui tendrait même à s'abaisser ; ces derniers résultats vont dans le sens de protéines liantes différentes : d'une part la transcortine liant le cortisol, d'autre part, une ou des protéines liant les hormones sexuelles. Récemment, l'hypothèse d'une seule protéine liant T ou E_2 (94) au même site (303) a été avancée : la constante d'association de T serait supérieure à celle de E_2 . Dans presque tous les cas où nous avons étudié simultanément l'affinité de liaison de T et de E_2 , la même évolution a été constatée : c'est un argument indirect en faveur de l'existence d'une seule protéine liant les hormones sexuelles. Notons cependant une évolution discordante

dans 50 % des cas de virilisme pileaire étudiés, où l'affinité de liaison de E_2 n'est pas modifiée alors que celle de T est abaissée. On peut envisager toujours dans l'hypothèse d'une seule protéine de liaison, des compétitions par d'autres stéroïdes endogènes.

IV - CONCLUSION

Si l'existence de protéines spécifiques de liaison pour certains stéroïdes est maintenant un fait bien établi, la signification physiologique de cette liaison est imprécise : elle ne paraît pas indispensable pour un fonctionnement glandulaire normal. La persistance d'une sécrétion de testostérone satisfaisante chez l'homme hyperthyroïdien, un fonctionnement ovarien normal chez la femme atteinte de virilisme pileaire idiopathique, l'absence de signes cliniques accompagnant les cas d'insuffisance de transcortine ou de TBG (thyroxine binding globulin) en sont, dans l'espèce humaine autant d'arguments.

L'affinité de liaison de la testostérone paraît constituer le témoin biologique le plus fidèle de l'état d'androgénie : quel que soit le taux de la testostérone totale du plasma, élevé dans la thyrotoxicose masculine, normal ou élevé dans les états d'hyperandrogénie de la Femme, il semble que l'existence d'une affinité de liaison élevée de la testostérone soit incompatible avec un état d'hyperandrogénie clinique et que la seule anomalie biologique constante associée à un état d'hyperandrogénie soit celle d'une faible activité de liaison de la testostérone.

CHAPITRE VII

TESTOSTERONE ET EPITESTOSTERONE

(LIBRES ET SULFATES)

CHEZ LE MOUTON

Bien que la présence de l'épitestostérone dans le sang des ruminants ait été démontrée depuis plus de 10 ans par Lindner (142, 143), aucune information n'a été apportée à ce jour concernant sa concentration plasmatique.

Ce fait nous a incité à entreprendre une étude du métabolisme des androgènes chez le Mouton. Nous rapportons ici les premiers résultats portant :

- d'une part sur les concentrations plasmatiques de l'épitestostérone et de la testostérone (libres et sulfates) chez le bélier,

- d'autre part sur l'affinité de liaison de ces mêmes stéroïdes pour les protéines sériques du bélier, de la brebis et de la brebis gestante.

A - Concentrations plasmatiques de T, EpiT (libres et sulfates) chez le bélier.

1 - Protocole expérimental.

a - Matériel.

Dix béliers, race Ile de France, âgés de 9 à 11 mois ont servi pour cette étude, réalisée au mois de Janvier. Le sang (environ 30 ml par animal) a été prélevé stérilement au niveau d'une jugulaire, collecté dans un tube contenant de l'héparine et centrifugé environ 45 mn après le prélèvement. Les plasmas décantés ont été réunis. Le volume total plasmatique était de 140 ml.

b - Technique.

Le protocole suivi a été le même que celui mis au point pour le dosage des mêmes stéroïdes à partir d'un pool de plasma humain. Les différentes étapes sont rapportées dans la figure 30 de la page 135. Le tableau ci-dessous donne des précisions sur les stéroïdes radioactifs ajoutés et l'anhydride acétique utilisé pour chaque stéroïde :

	Stéroïdes radioactifs	Anhydride acétique
T	4- ¹⁴ C - 20 x 10 ³ cpm, 40 ng	{ ³ H - 100 mCi/mM
S-EpiT	4- ¹⁴ C - 46 " , 100 ng	
EpiT	1,2- ³ H - 47 " , 63 ng	{ ¹⁴ C - 10 mCi/mM
S-T	1,2- ³ H - 120 " , 3 ng	

Les rapports isotopiques $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ ont été évalués après purifications chromatographiques, dans les isomères des méthoximes des différents acétates de stéroïde.

Le même protocole a été appliqué à partir de 140 ml d' H_2O distillée, le rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ obtenu a servi de témoin aqueux. Le tableau L montre la bonne concordance des valeurs du rapport isotopique dans les différents dérivés méthoximes.

2 - Résultats.

Le tableau LI montre les résultats obtenus chez le bélier et rappelle les valeurs obtenues chez l'homme adulte pour les mêmes stéroïdes (à noter que les plasmas des deux espèces ont été obtenus à la même période de l'année - en Janvier). La testostérone plasmatique est beaucoup plus faible chez le bélier que chez l'homme, alors que la concentration du sulfate de testostérone est du même ordre de grandeur dans les deux espèces. L'épitestostérone plasmatique est mesurable chez le bélier alors que cela n'a pas été possible chez l'homme dans les mêmes conditions techniques. Son taux représente 50 % de celui de la testostérone, quant au sulfate d'épitestostérone, sa valeur a été trouvée beaucoup plus faible que chez l'homme.

TABLEAU I
Rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ obtenus dans les isomères méthoximes (MO) des acétates
de T et d'EpiT (plasma et témoin aqueux)

	Plasma		Témoin	
	(MO) ₁	(MO) ₂	(MO) ₁	(MO) ₂
T	4,70	5,00	1,76	1,89
ST	1,42	1,49	2,52	2,45
EpiT	2,27	2,50	4,15	4,00
S-EpiT	1,95	2,20	1,10	1,12

TABLEAU LI

Concentrations plasmatiques en $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ de plasma de la testostérone (T), et de l'epitestostérone (EpiT), libres et sulfates chez le béliet.

Stéroïde	Bélier	Homme
T	0,170	0,470
ST	0,110	0,120
EpiT	0,060	<0,030
S EpiT	0,085	0,420

B - Affinité de liaison stéroïdes-protéines sériques
chez le Mouton.

1 - Protocole expérimental.

Les moutons qui ont servi à cette étude provenaient du même élevage, race Ile de France (service du Pr. Rombault - INRA). Le sang, prélevé stérilement au niveau d'une jugulaire, a été collecté dans un tube stérile. Après retraction du caillot, le sérum a été décanté et ~~débarassé~~ des hématies par centrifugation : les sérums hémolysés ont été éliminés.

L'affinité (1/P) à 50 % de liaison a été évaluée selon le procédé de Pearlman et Crépy (98) chez le bélier, la brebis, la brebis gestante ou en période de lactation. Comme dans l'étude réalisée chez l'homme, la liaison résiduelle après chauffage du sérum 1 h à 60°C a été établie dans la plupart des cas.

2 - Résultats.

a - Affinité de liaison de la testostérone.

Le tableau LII montre :

- une faible affinité (1/P) de la testostérone chez le Mouton dans les deux sexes,

- l'absence de différence des valeurs de $(1/P)_T$ selon le sexe, $p > 0,3$.

TABLEAU LII

Affinité de liaison de la testostérone $(1/P)_T$ chez le Mouton en L/g de protéine.

	Bélier	Brebis	Brébis gestante	Brébis (lactation)
$(1/P)_T$	0,47	0,48	0,39	3e m.
	0,60	0,45	0,40	3e m.
	0,54	0,62	0,50	3e m.
	0,75	0,55	0,45	4e m. 0,56
		0,72	0,62	5e m. 0,62
		0,55	0,63	5e m. 0,53
			0,65	5e m. 0,47
			0,46	5e m.
			0,50	5e m.
M ± DS	0,59±0,12	0,56±0,10	0,51±0,10	0,54±0,07
$(1/P)_T$	0,19	0,18	0,17	
	0,21		0,22	
	Moyenne (n = 5) 0,19 ± 0,02			

* Etabli après chauffage à 60° pendant 1 h.

- l'absence de modification de $(1/P)_T$ au cours de la gestation ou de la lactation,

- une valeur de $(1/P)_T$ après chauffage à 60°C plus faible chez le Mouton que chez l'Homme, laissent supposer une affinité plus faible de la testostérone pour l'albumine de Mouton que pour l'albumine humaine.

b - Affinités de liaison de EpiT, S-EpiT et ST

L'affinité de liaison $(1/P)$ de l'épitestostérone était faible chez l'Homme : elle a été trouvée encore plus faible et à peine mesurable chez le Mouton.

Les affinités de liaison $(1/P)$ des sulfates d'épitestostérone et de testostérone ont été plus basses que chez l'Homme et on n'a pas retrouvé ici la forte affinité de liaison du sulfate de testostérone (pour une étude comparative des valeurs se reporter aux tableaux LXII et LXIII).

C - Discussion

1 - Concentrations plasmatiques de la testostérone.

La période choisie pour ce dosage ne correspond pas au maximum de l'activité hormonale qui se situe chez le bélier, dans nos régions, en Août-Septembre. Cependant un dosage de testostérone fait à partir d'un pool de plasmas sanguins de béliers en Septembre montre une augmentation seulement de 50 % par rapport à la

TABLEAU LIII

Affinité de liaison (1/P) de l'épitéstostérone (libre et sulfate)
et du sulfate de testostérone chez le Bélier, la Brebis et la
Brebis gestante.

	EpiT		ST		S-EpiT	
	(1/P)	(1/P)*	(1/P)	(1/P)*	(1/P)	(1/P)*
Bélier	0,07	0,05	0,70	0,19	0,64	0,13
	0,13	0,10	0,90	0,30	-	-
Brebis	0,20	0,12	0,50	0,22	-	-
Brebis gestante	0,29	0,17	0,63	0,23	0,35	0,18
	0,27	0,20	-	-	0,43	0,25

(1/P)* : Affinité de liaison résiduelle établie après chauffage
du sérum à 60°C pendant 1 h.

valeur obtenue en Janvier : la concentration de la testostérone plasmatique semble donc nettement inférieure à celle de l'homme adulte normal.

2 - Affinités de liaison du sérum de Mouton.

Bien que l'épitestostérone libre soit mesurable chez le bélier, sa présence ne s'accompagne pas d'une affinité de liaison appréciable du sérum pour ce stéroïde.

D'une manière générale, les affinités de liaison mesurées sont faibles et ne semblent pas répondre aux mêmes stimuli physiologiques que chez l'Homme : notamment absence de différence selon le sexe, et absence de modification au cours de la gestation. Nous retrouvons dans le cas des hormones sexuelles ce que Lindner avait déjà constaté pour le cortisol (304). Il ne semble pas que chez le Mouton, les protéines spécifiques de liaison aient la même importance que chez l'Homme.

RESUME

Différents problèmes analytiques, métaboliques et physiologiques concernant la 17β -OH-andros-4-èn-3-one (testostérone) et la 17α -OH-androst-4-èn-3-one (épitestostérone), libres et sulfates ont été abordés chez l'Homme et partiellement chez le Mouton.

1 - L'introduction générale (chapitre I) rappelle les principaux travaux concernant deux aspects nouveaux et importants du métabolisme des stéroïdes : d'une part leurs conjugaisons, et à ce propos des résultats personnels concernant l'aromatisation de différents C_{19} -stéroïdes libres et conjugués chez la femme enceinte sont rapportés, d'autre part leurs liaisons éventuelles à des protéines sériques. Toute étude du métabolisme des stéroïdes doit tenir compte de ces deux aspects.

2 - L'étude des dérivés méthoximes (chapitre II) entreprise dans un premier temps, pour le dosage de la testostérone et de l'épitestostérone par double dilution isotopique, s'est étendue à de nombreux stéroïdes cétoniques. Des informations nouvelles ont été apportées, concernant la cinétique de formation des méthoximes, leurs comportements chromatographiques en couche mince et en phase gazeuse, le type de fragmentation obtenu par spectrométrie de masse de certains d'entre eux. L'intérêt des méthoximes dans l'étude des groupements cétone (nombre et position dans la molécule de stéroïde) a été discuté.

3 - Différentes techniques (chapitre III) ont été utilisées dans l'étude du métabolisme de la testostérone et de l'épitéstostérone. Certaines d'entre elles, classiques, ont été adaptées en fonction du problème à résoudre (choix des systèmes chromatographiques, procédés d'hydrolyse ou d'extraction, identification par cristallisations successives d'un métabolite radioactif après addition du même composé de référence non radioactif). D'autres techniques ont nécessité une mise au point particulière. Il s'agit :

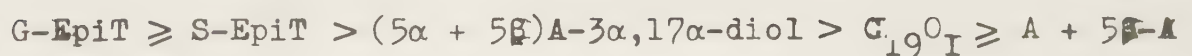
de la synthèse de différents stéroïdes.

- synthèse enzymatique de 4-¹⁴C-épitéstostérone après incubation de 4-¹⁴C-androstène-dione et de globules rouges de Mouton,
- synthèse des sulfates de testostérone et d'épitéstostérone radioactifs (³H et ¹⁴C) et non radioactifs,
- synthèse du 5β-androstane-3α,17α-diol,
- synthèse du 3α-androst-16-ène.

du dosage par double dilution isotopique de la testostérone et de l'épitéstostérone (libres et sulfates) : le standard interne a été le stéroïde ³H ou ¹⁴C, l'indicateur radioactif a été l'anhydride acétique, tritiée ou marquée avec du ¹⁴C suivant le problème à résoudre. L'utilisation du dérivé méthoxime de l'acétate du stéroïde doublement marqué a augmenté la spécificité de ce dosage.

4 - Le chapitre IV traite du métabolisme de la testostérone et de l'épitestostérone (libres et sulfates) chez l'homme adulte normal, après administration du ou des stéroïdes radioactifs à dose traceuse. Les principaux résultats obtenus sont les suivants :

- mise en évidence du sulfate d'épitestostérone dans le sang et l'urine,
- existence d'une production importante de sulfate d'épitestostérone (≈ 2 mg/24 h),
- taux non décelable d'épitestostérone libre dans le plasma, mais de l'ordre de 20 μ g/100 ml s'il est calculé à partir de la valeur de la clearance métabolique et du taux de production,
- très faible activité de la 17 α -hydroxy-stéroïde-deshydrogénase, comme le montre l'ordre d'importance croissant des métabolites isolés :



- clearance métabolique de l'épitestostérone élevée et voisine du flux sanguin hépatique. Faible clearance des sulfates notamment celle du sulfate de testostérone,
- faible excrétion urinaire de la radioactivité après injection des sulfates de testostérone (11,4 % en 5 jours) et d'épitestostérone (62 % en 3 jours). Un seul métabolite a été identifié dans chaque cas : le sulfate de testostérone (3,45 %) ou le sulfate d'épitestostérone (19,3 % de la dose injectée).

5 - Le chapitre V aborde le problème des rythmes biologiques. Un rythme circadien de la testostérone plasmatique et du glucuronide de testostérone a été mis en évidence chez l'homme adulte, et son amplitude peut atteindre 20 à 40 %. La signification réelle de ce rythme reste à préciser. Cependant ce fait doit être considéré dans l'établissement du taux de production de la testostérone par la méthode plasmatique, calculé à partir du MCR et de la concentration plasmatique de l'hormone.

6 - Les liaisons stéroïdes-protéines sont abordées dans le chapitre VI. L'index de liaison a été le plus souvent mesuré après dialyse à l'équilibre avec du Séphadex G 25 ; l'affinité à 50 % de liaison ($1/P$), exprimée en L/g de protéines, a été évaluée pour la testostérone, l'épitestostérone (libres et sulfates) l'oestradiol et le cortisol. Dans certains cas, la mesure a été faite dans des sacs de cellophane contre une solution de sérum-albumine ; une constante d'association apparente en L/Mole et une capacité de liaison apparente en Mole/L ont été calculées pour la testostérone. Les principaux résultats obtenus sont les suivants :

- absence de liaison spécifique de l'épitestostérone (libre et sulfate).

- forte liaison du sulfate de testostérone à la sérum-albumine,

- augmentation de l'affinité de liaison de la testostérone sous l'influence des hormones thyroïdiennes, diminution sous l'action des androgènes et valeur basse de cette affinité dans l'hirsutisme.

- évolution parallèle des affinités de liaison de la testostérone et de l'oestradiol dans les diverses circonstances physiopathologiques étudiées.

7 - Le chapitre VII aborde certains aspects du métabolisme des mêmes stéroïdes chez le Mouton. Il est constaté :

- une concentration plasmatique faible de la testostérone, très faible mais mesurable de l'épitestostérone chez le bélier,

- une faible affinité de liaison ($1/P$) de la testostérone et de l'épitestostérone (libres et sulfates) aux protéines sériques,

- l'absence de différence dans la valeur de ($1/P$) de la testostérone, selon le sexe,

- l'absence de modification de $(1/P)_T$ au cours de la gestation.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - BONGIOVANNI A.M. et EBERLEIN W.R.,
J. Clin. Endocr. : 17, 238, 1957.
- 2 - KELLIE A.E. et WADE A.P.,
Biochem. J. : 66, 196, 1957.
- 3 - BAULIEU E.E.,
Compt. Rend. Acad. Sci. : 251, 1421, 1960.
- 4 - VANDE WIELE R.L., MAC DONALD P.C., BOLTE E. et
LIEBERMAN S.,
Recent Progr. in Hormone Research : 19, 275, 1963
- 5 - BAULIEU E.E., CORPECHOT C., DRAY F., EMILIOZZI R.,
LEBEAU M.C., MAUVAIS-JARVIS P. et ROBEL P.,
Recent Progr. in Hormone research : 21, 411, 1965.
- 6 - BAULIEU E.E., CORPECHOT C. et EMILIOZZI R.,
Steroids : 2, 429, 1963.
- 7 - CALVIN H.I., VANDE WIELE R.L. et LIEBERMAN S.,
Biochemistry : 2, 648, 1963.
- 8 - BAULIEU E.E. et DRAY F.,
J. Clin. Endocr. 23, 1298, 1963.
- 9 - SIITERI P.K. et MAC DONNALD P.C.
Steroids : 2, 713, 1963.
- 10 - BOLTE E., MANCUSO S., ERIKSSON E., WIKVIST N. et
DICZFALUZY E.,
Acta Endocr. : 45, 1964, 535, 560 and 576
- 11 - WARREN J.C. et TIMBERLAKE C.E.,
Obst. Gynecol. : 23, 689, 1964.
- 12 - RYAN K.J.,
J. Biol. Chem. : 234, 268, 1959.

- 13 - MORATO T., LEMUS A.E. et GUAL C.,
Steroids : Suppl- 1, 59, 1965.
- 14 - HARPER M.J.K.,
Endocrinology : 84, 229, 1969.
- 15 - PUGHE R.C. et ROMANO M.C.,
Calc. Tiss. Res. : 2, 133, 1968.
- 16 - DRAYER N.M. et LIEBERMAN S.,
Biochem. Biophys. Res. Commun. : 18, 126, 1965.
- 17 - GURPIDE E., ROBERTS K.D., WELCH T., BANDY L. et
LIEBERMAN S.,
Biochemistry : 5, 3352, 1966.
- 18 - DRAYER N.M. et LIEBERMAN S.,
J. Clin. Endocr. : 27, 136, 1967.
- 19 - MOSER H.W., MOSER A.B. et ORR J.C.,
Biochem. Biophys. Acta : 116, 146, 1966.
- 20 - DRAYER N.M., ROBERTS K.D., BANDY L. et LIEBERMAN S.,
J. Biol. Chem. : 239, 3112, 1964.
- 21 - NOSE Y. et LIPMANN F.,
J. Biol. Chem. : 233, 1348, 1958.
- 22 - BANERJEE R.K. et ROY A.B.,
Mol. Pharmacol. : 2, 56, 1966.
- 23 - RAGGATT P.R., DEAN P.D.G. et WHITEHOUSE M.N.,
Biochem. J. : 96, 26p, 1965.
- 24 - ROBERTS K.D., BANDY L., CALVIN H.I., DRUCKER W.D.
et LIEBERMAN S.,
Biochemistry : 3, 1983, 1964.
- 25 - BEGUE J.A.,
Compt. Rend. Acad. Sci. : 260, 3777, 1965.
- 26 - CONRAD S.H., PION R.J. et KITCHIN J.D.,
J. Clin. Endocr. 27, 114, 1967.
- 27 - EBERLEIN W.R.,
J. Clin. Endocr. : 25, 1101, 1965.

- 28 - FORTHERBY K.,
Vitamins Hormones (N.Y.) : 22, 153, 1964.
- 29 - LEBEAU M.C. et BAULIEU E.E.,
Endocrinology : 73, 832, 1963.
- 30 - ADAMS J.B.,
Biochem. Biophys. Acta : 82, 572, 1964.
- 31 - GUAL C., ROJO B., LEMUS A.E. et RIVERA R.
Soc. Mex. Nutr. Endocr. 3rd Meeting 126, 1962.
- 32 - WIELAND R.G., DECOURCY C., LEVY R.P., ZALA A.P. et
HIRSCHMANN H.
J. Clin. Invest. : 44, 159, 1965.
- 33 - ARCOS M., GURPEDE E., VANDE WIELE R.L. et LIEBERMAN S.
J. Clin. Endocr. : 24, 245, 1964.
- 34 - FUKUSHIMA D.K., BRADLOW H.L., HELLMAN et GALLAGHER T.F.,
J. Clin. Endocr. : 23, 266, 1963.
- 35 - LAATIKAINEN T., LATTINEN E.A. et VIHKO R.,
J. Clin. Endocr. : 29, 219, 1969.
- 36 - KILLINGER D.W. et SOLOMON S.,
J. Clin. Endocr. : 25, 290, 1965.
- 37 - LEBEAU M.C., ALBERGA A. et BAULIEU E.E.,
Biochem. Biophys. Res. Commun. : 17, 570, 1964.
- 38 - CALVIN H.I. et LIEBERMAN S.,
J. Clin. Endocr. : 26, 402, 1966.
- 39 - PION R.J., CONRAD S.H. et WOLF B.J.,
J. Clin. Endocr. : 26, 225, 1966.
- 40 - SAEZ J.M., SAEZ S. et MIGEON C.J.,
Steroids : 2, 1, 1967.
- 41 - LIPSETT M.B., SARFATY G.A., WILSON H., BARDIN C.W.
et FISHMAN L.M.
J. Clin. Invest. : 45, 1700, 1966.

- 42 - HORTON R., ROSNER J.M. et FORSHAM P.H.,
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. : 114, 400, 1963.
- 43 - CAMACHO A.M. et MIGEON C.J.,
J. Clin. Invest. : 43, 1083, 1964.
- 44 - DESSYPRIS A., DROSDOWSKY M.A., Mc NIVEN N.L. et
DORFMAN R.I.,
Proc. Soc. Exptl. Biol. (N.Y.) : 121, 1128, 1966.
- 45 - TAMM J.,
Deutsch. Med. Wschr. : 43, 1983, 1967.
- 46 - ROBEL P., EMILIOZZI R. et BAULIEU E.E.,
J. Clin. Endocr. : 27, 1290, 1967..
- 47 - ROBEL P.
Thèse de Sciences, Paris 1968.
- 48 - ROBEL P., EMILIOZZI R. et BAULIEU E.E.,
Compt. Rend. Acad. Sci. : 258, 1331, 1964.
- 49 - EIK-NES K., SHELLMAN J.A., LUMRY R. et SAMUELS L.T.
J. Clin. Endocr. : 411, 206, 1954..
- 50 - GOLDSTEIN A.
Pharmacol. Rev. : 1, 102, 1949.
- 51 - BENNHOLD H.,
In Transport Function of Plasma Proteins, Desgrez P.
and De Traverse P.M., Eds. Elsevier Publishing Co. (N.Y)
29-32, 1964.
- 52 - KLOTZ I.M.,
Science : 128, 815, 1958.
- 53 - EDSALL J.T. et WYMAN J.,
Academic Press Inc. (N.Y.) : 11, 591-660, 1958.
- 54 - DAUGHADAY W.H.,
J. Clin. Invest. : 37, 511, 1958.

- 55 - WESTPHAL U.,
In C.A. Villee and L.L. Engel Editors.
Mechanism of action of steroids hormones.
Pergamon Press (N.Y.) : 33, 1961.
- 56 - WESTPHAL U.,
J. Am. Oil Chem. Soc. : 41, 481, 1964.
- 57 - PLAGER J.E.,
J. Clin. Invest. : 44, 1234, 1965.
- 58 - WANG D.Y. et BULBROOK R.D.,
J. Endocr. : 39, 405, 1967.
- 59 - SANDBERG A.A., SLAUNWHITE W.R. Jr. et ANTONIADES H.N.,
Recent Progr. in Hormone Research : 13, 209, 1957.
- 60 - BUSH I.E.,
Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology :
11, 263, 1957.
- 61 - UPTON G.V. et BONDY P.K.,
Arch. Biochem. : 78, 197, 1958.
- 62 - DAUGHADAY W.H.,
J. Clin. Invest. : 37, 511, 1958.
- 63 - SEAL U.S. et DOE R.P.
J. Biol. Chem. : 237, 3136, 1962 a.
- 64 - SEAL U.S. et DOE R.P.,
Cancer Chemother. Rep. : 16, 329, 1962 b.
- 65 - SEAL U.S. et DOE R.P.
In Pincus G., Nakao T. and Tait J.F. Eds. Steroid
Dynamics ; Academic Press, (N.Y.) : 63, 1966.
- 66 - SANDBERG A.A., ROSENTHAL H., SCHNEIDER S.L. et
SLAUNWHITE W.R. Jr.,
In Pincus G., Nakao T. and Tait J.F. Eds. Steroid
Dynamics ; Academic Press (N.Y.) : 9, 1966.
- 67 - SLAUNWHITE W.R. Jr., SCHNEIDER S.L., WISSLER F.C. et
SANDBERG A.A.,
Biochemistry : 5, 3527, 1966.

- 68 - MULDOON T.G. et WESTPHAL U.,
J. Biol. Chem. : 242, 5626, 1967.
- 69 - DAUGHADAY W.H.
In Eisenstein A.B. Eds. The Adrenal Cortex ;
Little Brown and Company. Boston : 385, 1967.
- 70 - GALA R.R. et WESTPHAL U.
Endocrinology : 77, 841, 1965.
- 71 - SEAL U.S. et DOE R.P.,
Steroids : 5, 827, 1965.
- 72 - SANDBERG A.A. et SLAUNWHITE W.R. Jr.,
J. Clin. Invest. : 38, 1290, 1959.
- 73 - DAUGHADAY W.H., ADLER R.E., MANIZ I.K. et RASINSKI D.C.,
J. Clin. Endocr. : 22, 704, 1962.
- 74 - KELLER N., SENDELBECK L.R., RICHARDSON U.I., MOORE C.
et YATES F.E.,
Endocrinology : 79, 884, 1966.
- 75 - LABRIE F.,
Ph. D. Dissertation, Laboratoire d'Endocrinologie ;
Dept. de Physiologie, Univ. Laval Quebec, 1967.
- 76 - SANDBERG A.A., WOODRUFF M., ROSENTHAL H., NIENHOUSE S.
et SLAUNWHITE W.R. Jr.,
J. Clin. Invest. : 43, 1066, 1964.
- 77 - SLAUNWHITE W.R. Jr., LOCKIE G.N., BACH N. et
SANDBERG A.A.,
Science : 135, 1062, 1962.
- 78 - KAWAI A. et YATES F.E.,
Endocrinology : 79, 1040, 1966..
- 79 - MATSUI N. et ELAGER J.E.,
Endocrinology : 78, 1159, 1966.
- 80 - BLECKER M.,
Endocrinology : 79, 541, 1966.
- 81 - SANDBERG A.A. et SLAUNWHITE W.R. Jr.,
J. Clin. Invest. : 42, 51, 1963.

- 82 - KELLER N., RICHARDSON U.I. et YATES F.E.,
Endocrinology : 84, 49, 1969.
- 83 - ROSENTHAL H.E. SLAUNWHITE W.R. Jr. et SANDBERG A.A.
J. Clin. Endocr. : 29, 352, 1969.
- 84 - DOE R.P., ZINNEMAN H.H., FLINK E.B. et ULSTROM R.A.,
J. Clin. Endocr. : 20, 1484, 1960.
- 85 - LAYNE D.S., MEYER C.J., VAISHWANAR P.S. et PINCUS G.,
J. Clin. Endocr. : 22, 107, 1962.
- 86 - NELSON D.H., TANNEY H., MESTMAN G., GIESCHEN V.N.
et NILSON L.D.,
J. Clin. Endocr. : 23, 261, 1963.
- 87 - ZINNEMAN H.H., SEAL U.S. et DOE R.P.,
J. Clin. Endocr. : 27, 397, 1967.
- 88 - BILLIAR R.B., TANAKA Y., KNAPPENBERGER M., HERNANDEZ R.
et LITTLE B.,
Endocrinology : 84, 1152, 1969.
- 89 - SLAUNWHITE W.R. et SANDBERG A.A.,
J. Clin. Invest. : 38, 384, 1959.
- 90 - CHEN P.S. Jr., MILLS I.H. et BARTTER F.C.,
J. Endocr. : 23, 129, 1961.
- 91 - MERCIER C., ALFSEN A. et BAULIEU E.E.,
In Exley Ed., Androgens in normal and pathological
conditions ; Exerpts Medica Foundation International
Congress, série n° 101, Proceedings of the second
Symposium on steroids hormones ; Ghent, 212, 1965.
- 92 - MERCIER C. et BAULIEU E.E.
Annal. Endocr. : 29, 1 bis, 159, 1968.
- 93 - GUERIGIAN J.L. et PEARLMAN W.H.,
J. Biol. Chem. : 243, 5226, 1968.
- 94 - STEENO O., HEYNS W., VAN BAELEN H. et DE MOOR P.,
Annal. Endocr. : 29, 141, 1968.
- 95 - VAN BAELEN H., HEYNS W. et DE MOOR P.,
Annal. Endocr. : 30, 1 bis, 149, 1969.

- 96 - KATO T. et HORTON R.,
J. Clin. Endocr. : 28, 1160, 1968.
- 97 - PIZARRO M.A.,
Annal. Endocr. : 30, 1 bis, 205, 1969.
- 98 - PEARLMAN W.H. et CREPY O.,
J. Biol. Chem. : 242, 182, 1967.
- 99 - PEARLMAN W.H., CREPY O. et MURPHY M.,
J. Clin. Endocr. : 27, 1012, 1967.
- 100 - MERCIER C., ALFSEN A., et BAULIEU E.E.,
Compt. Rend. Acad. Sci. : 264, 122, 1967.
- 101 - FOREST M.G., RIVAROLA M.C. et MIGEON C.J.,
Steroids : 3, 323, 1968.
- 102 - VERMEULEN A. et VERDONCK L.,
Steroids : 5, 609, 1968.
- 103 - ROSNER W. et DEAKINS S.M.,
J. Clin. Invest. : 47, 2109, 1968.
- 104 - PEARLMAN W.H. et FONG F.F.,
Fed. Proceed. : 27, 2297, 1968.
- 105 - MERCIER-BODARD C. et BAULIEU E.E.,
Compt. Rend. Acad. Sci. : 264, 122, 1967.
- 106 - ROSENBAUM W., CHRISTY N.P. et KELLY W.G.,
J. Clin. Endocr. : 26, 1399, 1966.
- 107 - FALES H.M. et LUUKKAINEN T.,
Anal. Chem. : 37, 955, 1965.
- 108 - DRAY F. et WELIKY I.,
In Dunod Ed., Chromatographie en phase gazeuse des
stéroïdes hormonaux. : 105, 1967.
- 109 - KANOMATA I.,
Bull. Chem. Soc., Japan : 34, 1864, 1961.
- 110 - BARDIN C.W. et LIPSETT M.B.,
Steroids : 9, 71, 1967.

- 111 - HORNING D.G., MOSS A.M. et HORNING E.E.,
Anal. Chem. : 22, 284, 1968.
- 112 - WATSON D.J. et ROMANOFF E.B.,
J. Chromatog. : 22, 192, 1966.
- 113 - MOWSZOWICZ I. et DRAY F.,
Ann. Biol. Clin. : 25, 879, 1967.
- 114 - JAYLE M.F. et col.,
Analyse des stéroïdes hormonaux. Tome II, Masson et
Cie, Ed., Paris 1962, 447.
- 115 - KLIMAN B. et PETERSON R.E.,
J. Biol. Chem. : 235, 1960, 1963.
- 116 - PIDACKS E.,
Gordon, Research Conference on separation and puri-
fication. New London, (N.H), 1961.
- 117 - LAKSHMANAN T.K. et LIEBERMAN S.,
Arch. Biochem. Biophys. : 53, 258, 1954.
- 118 - BAULIEU E.E. et MAUVAIS-JARVIS P.,
J. Biol. Chem. : 239, 1569, 1964.
- 119 - CREPY O., JAYLE M.F. et MESLIN F.,
Acta Endocrinol. : 24, 233, 1957.
- 120 - GOWER D.B. et AHMAD N.,
Biochem. J. : 104, 550, 1967 a.
- 121 - ZAFFARONI A.,
Recent Progr. in Hormone Research : 8, 51, 1953.
- 122 - SAVARD K.,
J. Biol. Chem. : 202, 457, 1953.
- 123 - BUSH I.E.,
Biochem. J. : 50, 370, 1952.
- 124 - SCHNEIDER J.J. et LEWBART M.L.,
Recent Progr. in Hormone Research : 15, 201, 1959.
- 125 - BAULIEU E.E., MICHAUD G. et CORPECHOT C.,
Ann. Biol. Clin. Paris : 19, 291, 1961.

- 126 - MAC KENNA J. et NORIMBERSKI J.K.,
J. Chem. Soc. : 3889, 1957.
- 127 - OKITA G.J., KABARA J.J., RICHARDSON F. et LERDY G.V.,
Nucleics : 15, 111, 1957.
- 128 - LINDNER H.R.,
Nature, London : 183, 1605, 1959.
- 129 - EMILIOZZI R.,
Bull. Soc. Chim. de France : 911, 1960.
- 130 - GABBARD R.B. et SEGALOFF A.,
J. Org. Chem. : 27, 655, 1962.
- 131 - CAGLIOTI L. et MAGI M.,
Tetrahedron : 19, 1127, 1963.
- 132 - FRIEDMAN L.,
Organic Synthesis : 40, 93, 1960.
- 133 - FINKELSTEIN M., FORCHIELLI E. et DORFMAN R.I.,
J. Clin. Endocr. : 21, 98, 1961.
- 134 - FORCHIELLI E., SORCINI G., NIGHTINGALE M.S., BRUST N.,
DORFMAN R.I., PERLOFF W.H. et JACOBSON G.,
Anal. Biochem. : 5, 416, 1963.
- 135 - RIONDEL A., TAIT J.F., GUT M., TAIT S.A.S., JOACHIM E.
et LITTLE B.,
J. Clin. Endocr. : 23, 620, 1963.
- 136 - HUDSON B., COGHLAN J., DULMANIS A., WINTOUR M. et
EKKEL I.,
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. : 41, 235, 1963.
- 137 - KIRCHNER M.A., LIPSETT M.B. et COLLINS D.R.,
J. Clin. Invest. : 44, 657, 1965.
- 138 - BURGEN H.G., KENT J.R. et KELLIE A.E.,
J. Clin. Endocr. : 24, 432, 1964.
- 139 - BROWNIE A.C., VAN DER MOLEN J.J., NISHIZAWA E.E. et
EIK-NES K.B.,
J. Clin. Endocr. : 24, 1091, 1964.

- 140 - MURPHY B.E.P.,
Nature : 201, 679, 1964.
- 141 - FRITZ G.R. et KNOBIL E.,
Preliminary Report Fed. Proc. : 26, 757, 1967.
- 142 - LINDNER H.R.,
J. Endocr. : 23, 139, 1961 a.
- 143 - LINDNER H.R.,
J. Endocr. : 23, 161, 1961 b.
- 144 - KORENMAN S.G., WILSON H. et LIPSETT M.B.,
J. Clin. Invest. : 42, 1753, 1963.
- 145 - KORENMAN S.G., WILSON H. et LIPSETT M.B.,
J. Biol. Chem. : 239, 1004, 1964.
- 146 - BROOKS R.V. et GIULIANI G.,
Steroids : 4, 101, 1964.
- 147 - SCHUBERT K., WEHRBERGER K. et FRANKENBERG G.,
Naturwissenschaften : 24, 638, 1964.
- 148 - SPARAGANA M.,
Steroids : 5, 773, 1965.
- 149 - FUTTERWEIT W., FREEMAN R., SIEGEL G.L., GRIBOFF S.I.,
DORFMAN R.I. et SOFFER L.J.,
J. Clin. Endocr. : 25, 1451, 1965.
- 150 - KOCHAKIAN C.D. et STIDWORTHY G.,
J. Biol. Chem. : 196, 243, 1952.
- 151 - KOCHAKIAN C.D. et STIDWORTHY G.,
J. Biol. Chem. : 210, 933, 1954.
- 152 - KOCHAKIAN C.D. et NALL D.M.,
J. Biol. Chem. : 204, 91, 1953.
- 153 - AXELROD L.R., MILLER L.L. et HERLING F.,
J. Biol. Chem. : 219, 455, 1956.
- 154 - SHORT R.V.,
J. Endocr. : 22, 156, 1961.

- 155 - ACEVEDO H. et CORRAL-GALLARDO J.,
J. Clin. Endocr. : 25, 1975, 1965.
- 156 - LINDNER H.R.,
Steroids Suppl. : 2, 133, 1965.
- 157 - DRAY F. et LEDRU M.J.,
Compt. Rend. Acad. Sci. : 262, 679, 1966.
- 158 - DRAY F., MOWSZOWICZ I. et LEDRU M.J.,
Steroids : 10, 501, 1967.
- 159 - BLAQUIER Y., DORFMAN R.I. et FORCHIELLI E.,
Acta Endocr. : 54, 208, 1967.
- 160 - KAGI H. et MIESCHER K.,
Helv. Chim. Acta : 22, 683, 1939.
- 161 - WILSON H. et LIPSETT M.B.,
J. Clin. Endocr. : 26, 902, 1966.
- 162 - FUKUSHIMA D.G. et GALLAGHER T.F.,
J. Biol. Chem. : 229, 85, 1957.
- 163 - TAI-CHAN-PENG et MUNSON P.L.,
Steroids : 11, 105, 1968.
- 164 - BAULD W.J.,
Biochem. J. : 63, 488, 1956.
- 165 - PRELOG V. et RUZICKA L.,
Helv. Chim. Acta : 27, 61, 1944.
- 166 - PRELOG V., RUZICKA L. et WIELAND P.,
Helv. Chim. Acta : 27, 66, 1944.
- 167 - BROOKSBANK B.W.L. et HASLEWOOD G.A.D.,
Biochem. J. : 44, iii, 1949.
- 168 - MASON H.L. et SCHNEIDER J.Y.,
J. Biol. Chem. : 184, 593, 1950.
- 169 - ENGEL L.L., DORFMAN R.I. et ABARBANEL A.R.,
J. Clin. Endocr. : 13, 903, 1953.

- 170 - MILLER A.M., ROSENKRANTZ H. et DORFMAN R.I.,
Endocrinology : 53, 238, 1953.
- 171 - STYLIANOU M., FORCHIELLI E. et DORFMAN R.I.,
J. Biol. Chem. : 236, 1318, 1961.
- 172 - STYLIANOU M., FORCHIELLI E., TUMMILLO M. et DORFMAN R.I.,
J. Biol. Chem. : 236, 692, 1961.
- 173 - DORFMAN R.I.,
Metabolism : 10, 902, 1961.
- 174 - WILSON H., LIPSETT M.B. et KORENMAN S.G.,
J. Clin. Endocr. : 23, 491, 1962.
- 175 - CLEVELAND W.W. et SAVARD K.,
J. Clin. Endocr. : 24, 983, 1964.
- 176 - BURSTEIN S. et DORFMAN R.I.,
1 st. Int. Congr. Endocr., Copenhagen ; Short Commun.
n° 346, 1960.
- 177 - BROOKSBANK B.W.L.,
J. Endocr. : 24, 435, 1962.
- 178 - AHMAD N. et GOWER D.B.,
Steroids : 7, 273, 1966.
- 179 - GOWER D.B. et AHMAD N.,
Biochem. J. : 104, 550, 1967.
- 180 - TAIT J.F.,
J. Clin. Endocr. : 23, 1285, 1963.
- 181 - TAIT J.F. et BURSTEIN S.,
In "The Hormones", Academic Press, Edit. : V, 441, 1964.
- 182 - LEVIN J., FRIEDRICH C.H. et LOBOTSKY J.,
J. Clin. Endocr. : 25, 1520, 1965.
- 183 - WANG D.Y., BULBROOK R.D., SNEDDON A. et HAMILTON T.,
J. Endocr. : 38, 307, 1967.
- 184 - HORTON R. et TAIT J.F.,
J. Clin. Endocr. : 27, 79, 1967.

- 185 - KORENMAN S.G. et LIPSETT M.B.,
Steroids : 5, 509, 1965.
- 186 - CAMACHO A.M. et MIGEON C.D.,
J. Clin. Invest. : 43, 1083, 1964.
- 187 - RIVAROLA M.A., SAEZ J.M., MEYER W.J., JENKINS M.E.
et MIGEON C.I.,
J. Clin. Endocr. : 26, 1208, 1966.
- 188 - KLEITMAN N.,
Physiol. Rev. : 29, 1, 1949.
- 189 - ASCHOFF J.,
Z. Tierpsychol. : 15, 1, 1958.
- 190 - BUNNING E.,
Heidelberg : Springer - Verlag, 1964.
- 191 - REINBERG A. et GHATA J.,
P. U. F. (sec. Edit.) : 128, 1964.
- 192 - ASCHOFF J., (réf. GIERSE)
Klin. Wochschr. : 33, 545, 1955.
- 193 - CHOSSAT C.H.,
Mémoires présentés à l'Académie Royale des Sciences
de l'Institut de France : 8, 532, 1843.
- 194 - COOPER Z.K.,
J. Invest. Derm. : 2, 289, 1939?
- 195 - RUD F.,
Acta Psychiat. (KBh), suppl. : 40, 1, 443, 1947.
- 196 - STANBURY S.W. et THOMPSON A.E.,
Clin. Sci. : 10, 267, 1951.
- 197 - HARKER J.E.,
Biol. Rev. : 33, 1, 1958.
- 198 - ASCHOFF J.,
Ann. Rev. Physiol. : 25, 581, 1963.
- 199 - HARKER J.E.,
Cambridge : Cambridge Univ. Press., 1964.

- 200 - PITTENDRIGH C.S.,
Harvey Lect. Serv. 56, Acad. Press. : 93, 125, 1961.
- 201 - ASCHOFF J.,
Science : 148, 1427, 1965.
- 202 - MENZEL W.,
Bazel : Buennen Schwabe & Co. : 1962.
- 203 - MILLS J.N.,
Physiol. Rev. : 46, 128, 1966.
- 204 - HALBERG F.,
Z. Vitamin-Hormon-Ferment Forsch. : 10, 225, 1959.
- 205 - BUNNING E.,
Ann. Rev. Plant. Physiol. : 7, 71, 1956.
- 206 - HALBERG F.,
Circadian Systems, 39th Ross. Conf. Pediatric. Res.,
Ross. Labs., Columbus, Ohio : 1961.
- 207 - ASCHOFF J.,
Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol., Long Island
Biol. Ass. : 25, 11, 1960.
- 208 - BUNNING E.,
Springer Verlag, Berlin 2ème Edit. : 153, 1963.
- 209 - ASCHOFF I. et MEYER-LOHMANN J.,
Pflüg Arch. : 260, 170, 1954.
- 210 - KLEITMAN N et ENGELMAN Th.,
J. Appl. Physiol. : 6, 269, 1953.
- 211 - HELLBRUGGE T., EHRENGUT-LANGE J., RUTENFRANZ J. et
STEHR K.,
Ann. (N.Y.) Acad. Sci. : 117, 361, 1964.
- 212 - HALDBERG F.,
M-Kurse Äztl. Fortbild : 14, 67, 1964.
- 213 - PINCUS G.,
J. Clin. Endocr. : 3, 195, 1943.
- 214 - PINCUS G., ROMANOFF L.P., CARLO J.,
J. Clin. Endocr. : 8, 221, 1948.

- 215 - ROMANOFF L.P., PAGER J. et PINCUS G.,
Endocrinology : 45, 10, 1949.
- 216 - SANDBERG A.A., NELSON D.H., GLENN E.M., TYLER F.H. et
SAMUELS L.T.,
J. Clin. Endocr. : 13, 1445, 1953.
- 217 - SANDBERG A.A., NELSON D.H., PALMER J.G., SAMUELS L.T. et
TYLER F.H.,
J. Clin. Endocr. : 13, 629, 1953.
- 218 - BLISS E.L., SANDBERG A.A., NELSON D.H. et EIK-NES K.,
J. Clin. Invest. : 32, 818, 1953.
- 219 - DOE R.P., FLINK E.S. et ~~GOODELL~~ M.C.,
J. Clin. Endocr. : 16, 196, 1956.
- 220 - MIGEON C.J., TYLER F.H., MAHONEY J.P., FLORENTIN A.A.,
CASTLE H., BLISS E.L. et SAMUELS L.T.,
J. Clin. Endocr. : 16, 622, 1956.
- 221 - PETERSON R.C.,
J. Clin. Endocr. : 17, 1150, 1957.
- 222 - GORDON R.D., SPRINKS J., DULMANIS A., HUDSON B.,
HALBERG F. et BARTTER F.C.,
Clin. Sci. : 35, 307, 1968.
- 223 - PERKOFF G.T., EIK-NES K., NUGENT C.A., FRED H.L.,
NIMIER R.A., RUSH L., SAMUELS L.T. et TYLER F.H.,
J. Clin. Endocr. : 19, 432, 1959.
- 224 - PETERSON R.E.,
Recent Progr. in Hormone Research : 15, 231, 1959.
- 225 - ENGLERT E. Jr., BROWN H., WALLACH S. et SIMONS E.L.,
J. Clin. Endocr. : 17, 1395, 1957.
- 226 - TUCCI J.R., ALBACETE R.A. et MARTIN N.M.,
Gastroenterology : 50, 637, 1966.
- 227 - NUGENT C.A., EIK-NES K., KENT H.S., SAMUELS L.T. et
TYLER F.H.,
J. Clin. Endocr. : 20, 1259, 1960.

- 228 - GOLD E.M., DIRAIMONDO V.C. et FORSHAM R.H.,
Metabolism : 9, 3, 1960.
- 229 - MARTIN M.M. et EHLMAN J.E.,
J. Clin. Endocr. : 24, 253, 1964.
- 230 - LIPSCOMB H.S. et NELSON D.H.,
Endocrinology : 71, 13, 1962.
- 231 - NEY R.L., SHIMIZU N., NICHOLSON W.E., ISLAND D.P. et
LIDDLE G.W.,
J. Clin. Invest. : 41, 20, 1962.
- 232 - BINOU M., GIRARD F. et MOZZICONACCI P.,
Annal. de Pédiatrie : 41, 1614, 1965.
- 233 - DEMURA H., WEST C.D., NUGENT C.A., NAKAGAWA K. et
TYLER F.H.,
J. Clin. Endocr. : 26, 1297, 1966.
- 234 - YALOW R.S., GLICK S.M., ROTH J. et BERSON S.A.,
J. Clin. Endocr. : 24, 1219, 1964.
- 235 - MARTIN M.M. et HELLMAN D.G.,
J. Clin. Endocr. : 24, 253, 1964.
- 236 - GRABER A.L., NEY R.L., NICHOLSON W.E., ISLAND D.P.
et LIDDLE G.W.,
J. Clin. Endocr. : 25, 11, 1965.
- 237 - MARTIN M.M. et MINTZ D.H.,
J. Clin. Endocr. : 25, 20, 1965.
- 238 - EIK-NES K. et CLARK L.D.,
J. Clin. Endocr. : 18, 764, 1958
- 239 - HOKFELT B. et LUFT R.,
Acta Endocr. : 32, 177, 1959.
- 240 - KRIEGER D.T.,
J. Clin. Endocr. : 21, 695, 1961.

- 241 - Mc DONALD R.K., EVANS F.T., WEISE V.K. et PATRICK R.W.,
J. Pharmacol. Exptl. Therap. : 125, 241, 1959.
- 242 - CLAYTON G.W., LIBRIK L., GARDNER R.L. et GUILLEMIN R.,
J. Clin. Endocr. : 23, 975, 1963.
- 243 - SLUSHER M.A. et BROWNING B.,
Am. J. Physiol. : 200, 1032, 1961.
- 244 - HALBERG F.
VII Conf. Int. Soc. Stud. Ritmi. Biol. Siena, 1960.
Minerva Medica, Torino : 20, 1962.
- 245 - LAIDLAW J.C., JENKINS D., REDDY W.J. et JAKOBSON T.,
J. Clin. Invest. : 33, 1950, 1954.
- 246 - GHATA J., REINBERG A. et SIFFRE M.,
Annal. Endocr. : 30, 245, 1969.
- 247 - MULLER A.F., MANNING E.L. et RIONDEL A.M.,
Muller A.F. and C.M. O'Connor Eds., Aldostérone,
Little, Brown & Co., Boston : 111, 1958.
- 248 - LUETSCHER J.A. et LIEBERMAN A.H.,
Arch. Inter. Méd., Chicago : 102, 314, 1958.
- 249 - BARTTER F.C., DELGA C.S. et HALBERG F.,
Ann. N.Y. Acad. Sci. : 98, 969, 1962.
- 250 - GOWENLOCK A.H., MILLS J.N. et THOMAS S.,
J. Physiol., London : 146, 133, 1959.
- 251 - LUETSCHER J.A., DOWDY A.J., ARNSTEIN A.R., LUCAS C.P.
et MURRAY C.L.,
Baulieu E.E. and P. Robel Eds. Aldostérone,
Blackwell Scientific Publications, Oxford : 487, 1964.
- 252 - COHEN E.L., ROVNER D.R., CONN J.W. et BLOUGH W.M. Jr.,
Clin. Research. : 12, 362, 1964.
- 253 - GORDON R.D., WOLFE L.K., ISLAND D.P. et LIDDLE G.W.,
J. Clin. Invest. : 45, 1587, 1966.

- 254 - WOLFE L.K., GORDON R.D., ISLAND D.P. et LIDDLE G.W.,
J. Clin. Endocr. : 26, 1261, 1966.
- 255 - MIGEON C.J., KELLER A.R., LAWRENCE B. et SHEPARD T.H.,
J. Clin. Endocr. : 17, 1051, 1957.
- 256 - EIK-NES K., OERTEL G.W., NIMER R. et TYLER F.H.,
J. Clin. Endocr. : 19, 1405, 1959.
- 257 - FOTHERBY K. et STRONG. J.A.,
J. Endocr. : 19, 389, 1960
- 258 - Mc DONALD P.C., VANDE WIELE A.L. et LIEBERMAN S.,
J. Clin. Endocr. : 22, 1229, 1962.
- 259 - Mc KENNA J. et RIPPON A.E.,
Biochem. J. : 95, 105, 1965.
- 260 - LAATIKKAINEN T. et VIKHO R.,
J. Clin. Endocr. : 28, 1356, 1968.
- 261 - HALBERG F., ENGELI M., HAMBRUGER C. et HILLMAN D.,
Acta Endocr. Suppl. : 103, 1965.
- 262 - DRAY F., REINBERG A. et SEBAOUN J.,
Compt. Rend. Acad. Sci. : 261, 657, 1965.
- 263 - SOUTHREN A.L., TOCHIMOTO S., CARMODY N.C. et ISURUGI K.,
J. Clin. Endocr. : 25, 1441, 1965.
- 264 - SOUTHREN A.L., GORDON G.G., TOCHIMOTO S., PINZON G.,
LANE D.R. et STYPULKOWSKI W.,
J. Clin. Endocr. : 27, 686, 1967.
- 265 - RESKO J.A. et EIK-NES K.B.,
J. Clin. Endocr. : 26, 573, 1966.
- 266 - KIRSCHNER M.A., LIPSETT M.B. et COLLINS D.R.,
J. Clin. Invest. : 44, 657, 1965.
- 267 - LIPSETT M.B.,
Recent Progr. in Hormone Research : 22, 245, 1966.

- 268 - KOBAYASHI T., LOBOTSKY J. et LLOYD C.,
J. Clin. Endocr. : 26, 610, 1966.
- 269 - LEVIN J., LLOYD C., LOBOTSKY J. et FRIEDRICH E.H.,
Acta Endocr. : 55, 184, 1967.
- 270 - CRAFTS R., LLEBENA L.A., GUEVARA A., LOBOTSKY J. et
LLOYD C.W.,
Steroids : 12, 151, 1968.
- 271 - HUDSON B., COGHLAN J.P., DULMANIS A. et WINTOUR M.,
Proc. 2nd Inter. Congr. Endocr. - Part II -
Excerpta Medica Foundation : 1127, 1965.
- 272 - GORDON R.D., SPRINKS J., DULMANIS A., HUDSON B. et
BARTTER F.,
Australas Ana. Med. (abstract) : 14, 331, 1965.
- 273 - MIN. J.K., JONES J.E. et FLINK E.B.,
Fed. Proc. : 25, 917, 1966.
- 274 - CULBERTSON J.W., WILKINS R.W., INGELFINGER F.J. et
BRADLEY S.E.,
J. Clin. Invest. : 30, 305, 1951.
- 275 - TAIT J.F. et BURSTEIN S.,
In "The hormones" Acad. Press (N.Y.) : 1964.
- 276 - FAIRMAN C., et RYAN R.J.,
J. Clin. Endocr. : 27, 444, 1967.
- 277 - SAXENA B.B., DEMURA H., GANDY H.M. et PETERSON R.E.,
J. Clin. Endocr. : 28, 519, 1968.
- 278 - FRANCHIMONT P.,
Thèse d'agrégation, Editions Arscia, Bruxelles : 1966.
- 279 - ODELL W.D., ROSS G.T. et RAYFORD P.L.,
J. Clin. Invest. : 46, 248, 1967.
- 280 - PETERSON N.T., MIDGLEY A.R Jr. et JAFFE R.B.,
J. Clin. Endocr. : 28, 1473, 1968.

- 281 - SOUTHREN A.L., ROSS H., SHARMA D.C., GORDON G.,
WIENGOLD A.B. et DORFMAN R.I.,
J. Clin. Endocr. : 25, 518, 1965.
- 282 - KIRSCHNER M.A., LIPSETT M.B. et COLLINS D.R.,
J. Clin. Invest. : 44, 657, 1965.
- 283 - SORCINI G., SCIARRA F., CONCOLINO G. et RASCIO L.,
Folia Endocr., Pisa : 16, 449, 1963.
- 284 - RIVAROLA M.A., SAEZ J.M., MEYER W.J., JENKINS M.E
et MIGEON C.J.,
J. Clin. Endocr. : 26, 1208, 1966.
- 285 - COLAS A., GREGONIS D. et MOIR N.,
Endocrinology : 84, 165, 1969.
- 286 - GELOTTE B.,
J. Chromatog. : 3, 330, 1960.
- 287 - LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.Y., FARR A.L. et RANDALL R.J.,
J. Biol. Chem. : 193, 265, 1951.
- 288 - GORNALL A.G., BARDAWILL C.J. et DAVID M.M.,
J. Biol. Chem. : 177, 751, 1949.
- 289 - PETERS T. Jr.,
Clin. Chem. : 14, 1147, 1968.
- 290 - CHADER G.J. et WESTPHAL U.,
J. Biol. Chem. : 243, 928, 1968.
- 291 - WESTPHAL U., WILLIAMS W.C. Jr. et ASHLEY B.D.,
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. : 109, 926, 1962.
- 292 - SCATCHARD G.,
Ann (N.Y) Acad. Sci. : 51, 660, 1949
- 293 - DRAY F., SEBAOUN J., MOWSZOWICZ I., DELZANT G.,
DESGREZ P. et GILBERT-DREYFUS,
Compt. Rend. Acad. Sci. : 264, 2578, 1967.
- 294 - MOWSZOWICZ I. et DRAY F.,
Ann. Biol. Clin. : 25, 879, 1967.

- 295 - CREPY O., DRAY F. et SEBAOUN J.
Compt. Rend. Acad. Sci. : 264, 2651, 1967.
- 296 - GILBERT-DREYFUS, DRAY F., SEBAOUN J., DELZANT G.,
LEDRU M.J. et CREPY O.,
Excerpta Medica Foundation : 157, 55, 1968.
- 297 - DRAY F., SEBAOUN J., DELZANT G., LEDRU M.J. et
MOWSZOWICZ I.,
Rev. Fr. Et. Clin. et Biol. : XIII, 622, 1968.
- 298 - DRAY F., MOWSZOWICZ I., LEDRU M.J., CREPY O., DELZANT G.
et SEBAOUN J.,
Annal. Endocr. : 30, 1 bis, 223, 1969.
- 299 - DRAY F.,
Xème Réunion des Endocrinologistes de Langue Française,
Masson & Cie, Paris.
Annal. Endocr. : 159, 1969.
- 300 - PELLETIER G., LABRIE R. HO KIM M.A., DELGADO A.,
MAC INTOSH B. et FORTIER C.,
Annal. Endocr. : 29, 29, 1968.
- 301 - GORDON G.G., SOUTHREN A.L., TOCHIMOTO S., RAND J.J. et
OLIVO J.,
J. Clin. Endocr. : 29, 164, 1969.
- 302 - BARDIN C.W. et LIPSETT M.B.,
J. Clin. Invest. : 46, 891, 1967.
- 303 - MERCIER-BODARD G. et BAULIEU E.E.,
Compt. Rend. Acad. Sci. : 258, 1331, 1964.
- 304 - LINDNER H.R.,
J. Endocr. : 28, 301, 1964.
- 305 - BURSTEIN S. et LIEBERMAN S.,
J. Biol. Chem. : 233, 331, 1958.
- 306 - DRAY F. et WELIKY I.,
Anal. Biochem. : sous presse.

TABLE des TABLEAUX

CHAPITRE I

Pages

Tableau I	: Oestrogènes formés chez la femme enceinte après injection d'androgènes.....	3
Tableau II	: Incubations de placenta humain.....	5
Tableau III	: Métabolisme hépatique et placentaire du sulfate de DHA.....	7
Tableau IV	: Métabolisme du glucuronide de ^{14}C -T chez la femme enceinte...	12

CHAPITRE II

Tableau V	: Méthoximes de progestérone.....	29
Tableau VI	: Rapports isotopiques des MQ de progestérone.....	39
Tableau VII	: Méthoximes d'androstènedione...	42
Tableau VIII	: Méthoximes de testostérone.....	47
Tableau IX	: Cinétique de formation des MO de différents stéroïdes.....	55
Tableau X	: MO de 17β -OH- 5α / 5β -androstane-3-one et 5α / 5β -androstane 3,17-dione.....	57
Tableau XI	: Chromatographie en couche mince des MO de stéroïdes modèles....	58

CHAPITRE III.

Pages

Tableau XII	: Systèmes de solvants pour chromatographie sur célite.....	68
Tableau XIII	: Chromatographies en couche mince des acétates de T, EpiT, et de leurs méthoximes.....	88
Tableau XIV	: Dosage de la testostérone par double dilution isotopique : précision et sensibilité.....	91
Tableau XV	: Valeurs du "blanc" dans le dosage de la testostérone par double dilution isotopique.....	93
Tableau XVI	: Cristallisation de l'acétate de testostérone.....	94
Tableau XVII	: Dosage de la testostérone par radiocompétition.....	96

CHAPITRE IV.

Tableau XVIII	: Exp. HAMI., bilan des radio-activités retrouvées en 4 jours.	104
Tableau XIX	: Bilan des différentes fractions radioactives urinaires dans 5 expériences métaboliques.	106
Tableau XX	: T, Δ et EpiT dans la fraction libre urinaire.....	109
Tableau XXI	: Métabolites cétoniques dans 6 expériences.....	113
Tableau XXII	: Cristallisations de l'acétate d'EpiT (fractions sulfate et glucuronide).....	114
Tableau XXIII	: Cristallisations de l'androstérone et du 5 β -A.....	115

	Pages
Tableau XXIV : Exp. FEDJ., bilan complet des radioactivités.....	118
Tableau XXV : Administration simultanée de ^3H -T et ^{14}C -ST.....	120
Tableau XXVI : Administration de ^3H -S-EpiT...	122
Tableau XXVII : Composés de faible polarité...	126
Tableau XXVIII : Concentrations plasmatiques de T, ST, EpiT et S-EpiT.....	136
Tableau XXIX : Cristallisations des acétates de T et EpiT de la fraction sulfate du plasma.....	138
Tableau XXX : Excrétions urinaires du GT, du G-EpiT et du S-EpiT.....	139
Tableau XXXI : MCR et (1/P) de différents stéroïdes chez l'Homme.....	147
Tableau XXXII : Taux de production de la testostérone et de l'épitestostérone.....	152
Tableau XXXIII : Rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ de l'acétate et de la phénylhydrazone de l'acétate d'EpiT.....	153
Tableau XXXIV : T, ST et S-EpiT après ACTH et HCG.....	155

CHAPITRE V.

Tableau XXXV : Testostérone plasmatique au cours des 24 h chez 5 hommes..	173
Tableau XXXVI : Testostérone plasmatique et (1/P) _T chez 12 hommes normaux.	175

	Pages
Tableau XXXVII : Testostérone plasmatique au cours des 24 h chez la femme.	177
Tableau XXXVIII : Glucuronide de testostérone au cours des 24 h.....	178
Tableau XXXIX : Testostérone plasmatique avant et après ACTH.....	184
 <u>CHAPITRE VI.</u>	
Tableau XL : Evaluation de (1/P) : protocole expérimental.....	191
Tableau XLI : Variations de K' suivant le stéroïde.....	193
Tableau XLII : (1/P)albumine et (1/P) sérum chauffés à 60°C pour différents stéroïdes.....	203
Tableau XLIII : (1/P) et (Δ 1/P) de T, E ₂ et F chez le sujet normal.....	206
Tableau XLIV : (1/P) et (Δ 1/P) de T chez l'enfant prépubère.....	209
Tableau XLV : (1/P) et testostérone plasmatique dans les retards pubertaires.....	215
Tableau XLVI : Thyrotoxicose masculine, testostérone plasmatique et (1/P)T.....	217
Tableau XLVII : Thyrotoxicose féminine, testostérone plasmatique et (1/P)T.....	218
Tableau XLVIII : MCR et taux de production de la testostérone dans la thyrotoxicose masculine.....	221

	Pages
Tableau XLVIX. : $(1/P)_T$ dans l'hypothyroïdie féminine.....	222
CHAPITRE VII.	
Tableau L : Rapports $^3H/^{14}C$ dans les MO des acétates de T et EpiT.....	235
Tableau LI : $C_{19}O_2$ libres et sulfates dans le plasma du bélier.....	236
Tableau LII : $(1/P)_T$ chez le Mouton.....	238
Tableau LIII : $(1/P)$ de ST, EpiT, S-EpiT chez le Mouton.....	240

TABLE DES FIGURES

CHAPITRE II.

Pages

Figure 1	: Chromatographies en phase gazeuse de la progestérone et de ses dérivés "MO".....	30
Figure 2	: Cinétique de formation des MO de progestérone (chromatographie gazeuse).....	32
Figure 3	: Spectre de masse du 3,20-di-MO de progestérone.....	33
Figure 4	: Spectre de masse du 3-MO de progestérone.....	34
Figure 5	: Spectre de masse du 20-MO de progestérone.....	35
Figure 6	: Fragmentation par spectrométrie de masse des MO de progestérone.....	36
Figure 7	: Transfert du radical hydrogène expliquant les pics m/e 100 et m/e 87.....	37
Figure 8	: Cinétique de formation des MO de 4-androst-èn-3,17-dione (chromatographie gazeuse).....	41
Figure 9	: Spectre de masse du 3,17-di-MO de Δ^4	43
Figure 10	: Spectre de masse du 3-MO de Δ^4	44
Figure 11	: Spectre de masse du 17-MO de Δ^4	45

	Pages
Figure 12 : Chromatographie en couche mince et en phase gazeuse de la testostérone et des isomères du 3-MO de testostérone.....	48
Figure 13 : Cinétique de formation des isomères a et b du 3-MO de testostérone (suivie en couche mince).....	49
Figure 14 : Spectre de masse du 3-MO de testostérone.....	50
Figure 15 : Spectre infrarouge de l'isomère a, du 3-MO de testostérone.....	53
Figure 16 : Spectre infrarouge de l'isomère b, du 3-MO de testostérone.....	54

CHAPITRE III.

Figure 17 : Spectre infrarouge du sulfate d'épitestostérone.....	78
Figure 18 : Spectre de résonance magnétique nucléaire du 5 β -androstane-3 α ,17 α -diol.....	81
Figure 19 : Spectre de masse du 16-androstèn-3 α -ol.....	82
Figure 20 : Spectre infrarouge du 16-androstèn-3 α -ol.....	83
Figure 21 : Chromatographie sur colonne de cé- lite de quelques stéroïdes C ₁₉ O ₂ ...	86
Figure 22 : Chromatographie en phase gazeuse du 3-MO de l'acétate de testostérone.....	89
Figure 23 : Spectre de masse de l'acétate d'épitestostérone.....	98

CHAPITRE IV.

Pages

Figure 24	: Exp. HAMI-, radioactivité urinaire.....	103
Figure 25	: Gradient sur colonne d'alumine des différents androstanediols.....	117
Figure 26	: Comportement chromatographique (sur célite, syst. C3) de différents $\Delta 16-C_{19}O_1$	128
Figure 27	: Spectre de masse du composé X2.....	130
Figure 28	: Spectre de masse du 3α -OH-androstane	131
Figure 29	: Fragmentation par spectrométrie de masse du 3α -OH-androstane et du 3α -OH-androst-16-ène.....	132
Figure 30	: Protocole des dosages par double dilution isotopique de T et EpiT (libres et sulfates).....	135
Figure 31	: MCR de T et ST chez le même homme..	144
Figure 32	: MCR du S-EpiT chez 2 hommes.....	145
Figure 33	: MCR de l'EpiT chez 3 hommes.....	146

CHAPITRE V.

Figure 34	: Rythme circadien de la testostérone plasmatique, représentation par la méthode du cosinor.....	167
Figure 35	: Même rythme, représentation habituelle, moyenne $\pm$ DS.....	174
Figure 36	: Testostérone plasmatique et $(1/P)_T$ au cours des 24 h : 12 cas.....	176

CHAPITRE VI.

Pages

Figure 37	: Variations du coefficient de partage K' en fonction de la concentration en stéroïde.....	192
Figure 38	: Exemples de droites obtenues pour le calcul de $(1/P)_T$	196
Figure 39	: Variation de $(1/P)$ en fonction de $1/S_b$	197
Figure 40	: Représentation graphique de B/U en fonction de B , après dialyse à l'équilibre d'un sérum.....	200
Figure 41	: Filtration sur Séphadex G 25 de l'albumine liée à ^3H-T , $S-^3H-T$ et $S-^3H-EpiT$	204
Figure 42	: Capacité de liaison du sérum de sujets normaux, de femmes enceintes et d'hyperthyroïdiens.....	207
Figure 43	: $(1/P)$ de T , F et E_2 dans la grossesse, le virilisme pileux et l'hyperthyroïdie.....	211
Figure 44	: Testostérone plasmatique et $(1/P)_T$ dans le virilisme pileux.....	213
Figure 45	: $(1/P)_T$ avant et après administration d'hormones thyroïdiennes dans 13 cas de virilisme pileux.....	223

Discussion..... 59

- 1 - Nombre réel de méthoximes
- 2 - Eléments d'identification d'une fonction cétone
- 3 - Etude de l'encombrement stérique
- 4 - Intérêt des dérivés MQ dans l'analyse des stéroïdes

CHAPITRE III. Testostérone et épitestostérone (formes libres et sulfates)

Etudes métaboliques - Méthodologie

A - Méthodologie générale..... 63

- 1 - Matériel chimique
- 2 - Matériel biologique
- 3 - Systèmes chromatographiques utilisés
- 4 - Modalités d'étude des stéroïdes conjugués
- 5 - Critères d'identification
- 6 - Mesure de la radioactivité

B - Méthodologie particulière

1 - Synthèse de divers stéroïdes..... 75

- a - 4-¹⁴C-épitestostérone
- b - Sulfates de stéroïdes non radioactifs et radioactifs (3H ou ¹⁴C)
- c - 5 β -androstane-3 α ,17 α -diol
- d - 16-androstène-3 α -ol

2 - Dosage par double dilution isotopique..... 84

- a - Introduction
- b - Etude des différentes étapes
 - α - Testostérone plasmatique chez l'homme.. 85
 - Extraction et purification
 - Acétylation
 - Purification de l'acétate de T
 - Formation de dérivés
 - Mesure de la radioactivité et calculs
 - Critères de validité
 - Spécificité.

β - Testostérone plasmatique chez la femme.	95
3 - Testostérone plasmatique et radiocompétition.....	95
C - Problèmes méthodologiques : artefact de formation d'acétates de stéroïdes.....	97
1 - Critères d'identification de l'acétate d'EpiT	
2 - Formation <u>in vitro</u> de l'acétate d'épitestostérone	
 <u>CHAPITRE IV</u> . Testostérone et épitestostérone (formes libres et sulfates). Résultats des études Métaboliques.	
A - <u>Etudes métaboliques après administration de stéroïdes radioactifs.</u>	
1 - Métabolisme comparatif de la testostérone et de l'épitestostérone.....	100
a - Bilan radioactif de l'urine et de différentes fractions urinaires	
b - Etude de la fraction libre	
c - Etude des métabolites conjugués	
α - métabolites cétoniques	
β - métabolites non cétoniques	
2 - Métabolisme comparatif de la testostérone et du sulfate de testostérone.....	119
3 - Métabolisme du sulfate d'épitestostérone.....	121
4 - Aromatisation de ST, EpiT, S-EpiT.....	123
5 - Essais d'identification de composés de faible polarité.....	124
a - Arguments de parenté avec les $\Delta^{16C_{19}}$ stéroïdes	
b - Protocole expérimental	
c - Critères chromatographiques	
d - Critères d'identification	

B - <u>Taux plasmatique et urinaire de T et EpiT</u> (formes libres et sulfates).....	133
1 - Concentrations plasmatiques	
2 - Concentrations urinaires	
C - <u>Clearances métaboliques de T et EpiT</u> (formes libres et sulfates).....	140
Protocole expérimental	
a - Perfusion à débit constant	
b - Injection unique	
Résultats	
D - <u>Taux de production de T, EpiT et S-EpiT</u>	148
Principe	
Résultats	
1 - Production de T	
2 - Calcul de la concentration de l'EpiT plasmatique	
3 - Production du sulfate d'EpiT.	
E - <u>Epreuves dynamiques</u>	154
 <u>CHAPITRE V. Etude du rythme circadien de la testostérone</u>	
<u>Introduction</u>	156
1 - Définition des rythmes circadiens	
2 - Composants endogènes et exogènes des rythmes circadiens	
3 - Caractère inné des rythmes circadiens	
4 - Rythmes circadiens et sécrétions des stéroïdes chez l'homme.....	159
5 - Conditions d'étude et analyse d'un rythme circadien.....	165

Résultats personnels

A - Testostérone plasmatique chez l'homme.....	168
1 - Choix des sujets	
2 - Matériel	
3 - Résultats	
a - Première étude	
b - Deuxième étude	
B - Testostérone plasmatique chez la femme.....	171
C - Rythme circadien de la testostérone urinaire chez l'homme adulte.....	172
D - Discussion des résultats.....	179
a - La testostérone plasmatique chez l'homme	
b - La testostérone plasmatique chez la femme	
c - Rythme circadien et métabolisme de la testostérone	
d - Testostérone et stimulines hypophysaires	
e - Testostérone et ACTH	
<u>Conclusion</u>	185

CHAPITRE VI. Liaisons stéroïdes-protéines sériques: Aspects quantitatifs

I - <u>Méthodologie</u>	188
A - Dialyse à l'équilibre selon le procédé de Pearlman et Crépy.....	189
Principe	
Protocole expérimental	
Variations de K'	
Affinité de liaison (1/P)	
Activité de liaison ($\Delta 1/P$)	
Variation de (1/P) en fonction de 1/Sb	
Dosage des protéines	
Conservation du sérum	
Reproductibilité	

B - Dialyse à l'équilibre et dans des sacs de cellophane de sérum dilué, contre une solution d'albumine.....	198
1 - Protocole	
2 - Représentation graphique	
C - Stabilité des stéroïdes en solution aqueuse.....	199
II - <u>Résultats</u>	
A - Affinité de liaison des stéroïdes pour la sérum-albumine humaine et le sérum humain chauffé 1 h à 60°C.....	202
B - Index de liaison du sérum du sujet adulte normal.....	202
Testostérone	
- Index de Pearlman	
- Variations de (1/P) _T	
- Capacité de liaison (CL) et constante d'association (K)	
Oestradiol	
- Index de Pearlman	
Cortisol	
- Index de Pearlman	
Epitestostérone, sulfates de testostérone et d'épitestostérone	
C - Index de liaison de la testostérone avant la puberté.	208
D - Facteurs influençant la liaison de la testostérone, de l'oestradiol et du cortisol aux protéines du sérum humain.....	210
<u>Hormones sexuelles</u>	210
1 - Au cours de la grossesse	
2 - Administration d'oestrogènes	
3 - Rôle des androgènes	
α - Virilisme pileux	
β - Retard pubertaire masculin	
γ - Administration d'HCG	
δ - Administration d'androgènes	
ξ - Puberté précoce	

<u>Hormones thyroïdiennes</u>	216
1 - Hyperthyroïdie	
α - Testostérone	
β - Oestradiol et Cortisol	
2 - Hypothyroïdie	
3 - Administration d'hormones thyroïdiennes	
III - <u>Signification physiologique de la liaison tes-</u> <u>tostérone protéines-sériques</u>	
A - <u>Facteurs hormonaux</u>	225
1 - Les oestrogènes	
2 - Les androgènes	
3 - Les hormones thyroïdiennes	
4 - Mode d'action des oestrogènes et des hormones thyroïdiennes	
B - <u>Clearance métabolique de la testostérone (MCR)</u>	227
1 - Suivent le sexe	
2 - Au cours du nycthémère	
3 - Au cours de l'hyperthyroïdie	
4 - Dans le virilisme pileaire	
C - <u>Taux plasmatique de la testostérone</u>	228
1 - Chez l'homme adulte	
2 - Chez la femme adulte	
D - <u>Production de la testostérone</u>	229
1 - Chez l'homme adulte	
2 - Chez la femme adulte	
E - <u>Caractères différentiels des protéines de liaison</u> ...	230
IV - <u>Conclusion</u>	231

CHAPITRE VII. Testostérone et épitestostérone (libres
et sulfates) chez le Mouton.

A - Concentrations plasmatiques.....	233
B - Index de liaison aux protéines sériques.....	237
C - Discussion.....	239
<u>RESUME</u>	242
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	247
<u>TABLE DES TABLEAUX</u>	269
<u>TABLE DES FIGURES</u>	274

